

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
6. Dezember 2001 (06.12.2001)

PCT

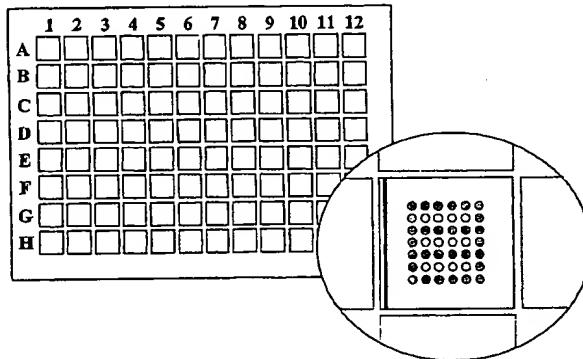
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 01/92870 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: G01N 33/00 (72) Erfinder; und  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/05995 (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PAWLAK, Michael  
(22) Internationales Anmeldedatum: 25. Mai 2001 (25.05.2001) (DE/DE); Andelsbachstrasse 5, 79275 Laufenburg (DE).  
(25) Einreichungssprache: Deutsch SCHICK, Eginhard [DE/DE]; Nordschwabener Strasse 9,  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch 79618 Rheinfelden (DE). ABEL, Andreas, P. [CH/CH];  
(30) Angaben zur Priorität: 2000 1104/00 2. Juni 2000 (02.06.2000) CH Rotbergerstrasse 16a, CH-4054 Bascl (CH). DUVE-  
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme NECK, Gert, L. [DE/DE]; Ezmattnweg 34, 79189 Bad  
von US): ZEPTOSENS AG [CH/CH]; Bcnkenstrasse 254, Krozingen (DE). EHRAT, Markus [CH/CH]; Im Brüel  
CH-4108 Witterswil (CH). 6, CH-4312 Magden (CH). KRESBACH, Gerhard, M. [DE/DE]; Burghaldenweg 6, 79219 Staufen (DE).  
(74) Gemeinsamer Vertreter: ZEPTOSENS AG; Bcnkenstrasse 254, CH-4108 Witterswil (CH).  
BRUNNMATTstrasse 11, CH-4053 Basel (CH).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: KIT AND METHOD FOR DETERMINING A PLURALITY OF ANALYTES

(54) Bezeichnung: KIT UND VERFAHREN ZUR MULTIANALYTBESTIMMUNG



**WO 01/92870 A2**  
(57) Abstract: The invention relates to various embodiments of a kit for simultaneous, qualitative and/or quantitative detection of a plurality of analytes, comprising a sensor platform consisting of a thin-layered optical wave guide with a layer (a) which is transparent at least at one excitation wavelength on a layer (b) which is also transparent at least at the same excitation wavelength, having a lower refraction index than layer (a), and at least one lattice structure (c) modulated in layer (a); in addition to at least one array of biochemical or synthetic detector elements immobilized on layer (a) and disposed in discrete measuring areas (d) either directly or by means of an adhesion promoting layer. Said detector elements are used for specific detection and/or bonding of said analytes and/or specific interaction therewith. The inventive kit also contains means for local resolution referencing of the excitation light intensity present in the measuring areas in addition to, optionally, means for calibrating at least one luminescence produced as a result of bonding between one or several analytes or as a result of the specific interaction with one or several analytes in the near field of layer (a). A liquid sample in which the analytes are to be examined is brought into contact, either directly or after mixing it with other reagents, with the measuring areas on the sensor platform. The invention also relates to analytic systems based on the inventive kit, methods which are conducted in order to detect one or several analytes and the use thereof.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft verschiedene Ausführungsformen eines Kits zum gleichzeitigen qualitativen und/oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend: eine Sensorplattform umfassend einen optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

**BEST AVAILABLE COPY**



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

---

bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in der Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c) zur Einkopplung besagten Anregungslichts in die Schicht (a); mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt auf oder über eine Haftvermittlungsschicht auf der Schicht (a) immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und/oder Bindung besagter Analyten und/oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten; Vorkräfte zur ortsauflösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität sowie gegebenenfalls; Vorehrungen zur Kalibration einer oder mehrerer infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen, wobei eine auf besagte Analyten zu untersuchende flüssige Probe entweder direkt oder nach Mischung mit weiteren Reagentien mit besagten Messbereichen auf besagter Sensorplattform in Kontakt gebracht wird. Die Erfindung betrifft auch auf dem erfindungsgemäßen Kit basierende analytische Systeme sowie damit durchgeführte Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten und deren Verwendung.

## Kit und Verfahren zur Multianalytbestimmung

Die Erfindung betrifft verschiedene Ausführungsformen eines Kits zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten. Die Erfindung betrifft auch auf dem erfindungsgemässen Kit basierende analytische Systeme sowie damit durchgeführte Verfahren zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten und deren Verwendung.

Zur Bestimmung einer Vielzahl von Analyten sind gegenwärtig vor allem Verfahren verbreitet, in denen in sogenannten Mikrotiterplatten der Nachweis unterschiedlicher Analyten in diskreten Probenbehältnissen oder "Wells" dieser Platten erfolgt. Am weitesten verbreitet sind dabei Platten mit einem Raster von 8 x 12 Wells auf einer Grundfläche von typischerweise ca. 8 cm x 12 cm, wobei zur Füllung eines einzelnen Wells ein Volumen von einigen hundert Mikrolitern erforderlich ist. Für zahlreiche Anwendungen wäre es jedoch wünschenswert, mehrere Analyten in einem einzigen Probenbehältnis, unter Einsatz eines möglichst kleinen Probenvolumens, gleichzeitig zu bestimmen.

In der US-P 5747274 werden Messanordnungen und Verfahren zur Früherkennung eines Herzinfarkts, durch die Bestimmung mehrerer von mindestens drei Herzinfarktmarkern beschrieben, wobei die Bestimmung dieser Marker in individuellen oder in einem gemeinsamen Probenbehältnis erfolgen kann, wobei im letzteren Falle, der gegebenen Beschreibung folgend, ein einziges Probenbehältnis als ein durchgehender Flusskanal ausgebildet ist, dessen eine Begrenzungsfläche beispielsweise eine Membran bildet, auf der Antikörper für die drei verschiedenen Marker immobilisiert sind. Es gibt jedoch keine Hinweise auf eine Bereitstellung von mehreren derartigen Probenbehältnissen oder Flusskanälen auf einem gemeinsamen Träger. Außerdem werden keine geometrischen Angaben über die Grössen der Messflächen gegeben.

In den WO 84/01031, US-P 5807755, US-P 5837,551 und US-P 5432,099 wird die Immobilisierung für den Analyten spezifischer Erkennungselemente in Form kleiner "Spots" mit teilweise deutlich unter  $1 \text{ mm}^2$  Fläche auf festen Trägern vorgeschlagen, um durch Bindung eines nur kleinen Teils vorhandener Analytmoleküle eine nur von der Inkubationszeit abhängige, aber – in Abwesenheit eines kontinuierlichen Flusses – vom absoluten Probenvolumen im wesentlichen unabhängige Konzentrationsbestimmung des Analyten vornehmen zu können. Die in den zugehörigen Ausführungsbeispielen beschriebenen Messanordnungen beruhen auf Fluoreszenznachweisen in konventionellen Mikrotiterplatten. Dabei werden auch Anordnungen beschrieben, in denen Spots von bis zu drei unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Antikörpern in einem gemeinsamen Mikrotiterplattenwell ausgemessen werden. Den in diesen Patentschriften dargelegten theoretischen Überlegungen folgend, wäre eine Minimierung der Spotgrösse wünschenswert. Limitierend wirke jedoch die minimale Signalhöhe, die vom Untergrundsignal unterschieden werden könne.

Zur Erreichung tieferer Nachweisgrenzen sind in den vergangenen Jahren zahlreiche Messanordnungen entwickelt worden, in denen der Nachweis des Analyten auf dessen Wechselwirkung mit dem evaneszenten Feld beruht, welches mit der Lichtleitung in einem optischen Wellenleiter verbunden ist, wobei auf der Oberfläche des Wellenleiters biochemische oder biologische Erkennungselemente zur spezifischen Erkennung und Bindung der Analytmoleküle immobilisiert sind.

Koppelt man eine Lichtwelle in einen optischen Wellenleiter ein, der von optisch dünneren Medien, d.h. Medien mit niedrigerem Brechungsindex, umgeben ist, so wird sie durch Totalreflexion an den Grenzflächen der wellenleitenden Schicht geführt. In die optisch dünneren Medien tritt dabei ein Bruchteil der elektromagnetischen Energie ein. Diesen Anteil bezeichnet man als evaneszentes oder quergedämpftes Feld. Die Stärke des evaneszenten Feldes ist sehr stark abhängig von der Dicke der wellenleitenden Schicht selbst sowie vom Verhältnis der Brechungsindices der wellenleitenden Schicht und der sie umgebenden Medien. Bei dünnen Wellenleitern, d. h. Schichtdicken von derselben oder niedrigerer Dicke als der zu führenden Wellenlänge, können diskrete Moden des

geleiteten Lichts unterschieden werden. Derartige Verfahren haben den Vorteil, dass die Wechselwirkung mit dem Analyten auf die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes ins angrenzende Medium, in der Größenordnung von einigen hundert Nanometern, beschränkt ist und Störsignale aus der Tiefe des Mediums weitgehend vermieden werden können. Die ersten vorgeschlagenen derartigen Messanordnungen beruhten auf hoch multimodalen, selbsttragenden Einschichtwellenleitern, wie beispielsweise Fasern oder Plättchen aus transparentem Kunststoff oder Glas, mit Stärken von einigen hundert Mikrometern bis zu mehreren Millimetern.

Zur Verbesserung der Empfindlichkeit und gleichzeitig einfacheren Herstellung in Massenfabrikation wurden planare Dünnschichtwellenleiter vorgeschlagen. Ein planarer Dünnschichtwellenleiter besteht im einfachsten Fall aus einem Dreischichtsystem: Trägermaterial, wellenleitende Schicht, Superstrat (bzw. zu untersuchende Probe), wobei die wellenleitende Schicht den höchsten Brechungsindex besitzt. Zusätzliche Zwischenschichten können die Wirkung des planaren Wellenleiters noch verbessern.

Es sind verschiedene Verfahren für die Einkopplung von Anregungslicht in einen planaren Wellenleiter bekannt. Die am frühesten benutzten Verfahren beruhten auf Stirnflächenkopplung oder Prismenkopplung, wobei zur Verminderung von Reflexionen infolge von Luftspalten im allgemeinen eine Flüssigkeit zwischen Prisma und Wellenleiter aufgebracht wird. Diese beiden Methoden sind vor allem in Verbindung mit Wellenleitern relativ grosser Schichtdicke, d. h. insbesondere selbsttragenden Wellenleitern, sowie bei einem Brechungsindex des Wellenleiters von deutlich unter 2 geeignet. Zur Einkopplung von Anregungslicht in sehr dünne, hochbrechende wellenleitende Schichten ist demgegenüber die Verwendung von Koppelgittern eine wesentlich elegantere Methode.

Mit dem Begriff "Lumineszenz" wird in dieser Anmeldung die spontane Emission von Photonen im ultravioletten bis infraroten Bereich nach optischer oder nichtoptischer, wie beispielsweise elektrischer oder chemischer oder biochemischer oder thermischer Anregung, bezeichnet. Beispielsweise sind Chemilumineszenz, Biolumineszenz,

Elektrolumineszenz und insbesondere Fluoreszenz und Phosphoreszenz unter dem Begriff "Lumineszenz" mit eingeschlossen.

Zur Erreichung sehr tiefer Nachweisgrenzen erscheinen lumineszenzbasierte Methoden aufgrund grösserer Selektivität der Signalerzeugung besser geeignet als solche Methoden, welche auf einer Änderung des effektiven Brechungsindex beruhen (wie beispielsweise Gitterkoppler-Sensoren oder Verfahren basierend auf Oberflächenplasmonenresonanz). Dabei ist die Lumineszenzanregung auf die Eindringtiefe des evaneszenten Feldes in das optisch dünnerne Medium, also auf die unmittelbare Umgebung des wellenleitenden Bereichs mit einer Eindringtiefe ins Medium in der Grössenordnung von einigen hundert Nanometern, beschränkt. Dieses Prinzip wird evaneszente Lumineszenzanregung genannt.

Mittels hochbrechender Dünnschichtwellenleiter, in Kombination mit Lumineszenzdetektion, basierend auf einem nur einige hundert Nanometer dünnen wellenleitenden Film auf einem transparenten Trägermaterial, konnte in den letzten Jahren die Empfindlichkeit deutlich gesteigert werden. Beispielsweise wird in der WO 95/33197 eine Methode beschrieben, in der das Anregungslicht über ein Reliefgitter als diffraktives optisches Element in den wellenleitenden Film eingekoppelt wird. Die Oberfläche der Sensorplattform wird mit einer den Analyten enthaltenden Probe in Kontakt gebracht, und die isotrop abgestrahlte Lumineszenz in der Eindringtiefe des evaneszenten Feldes befindlicher lumineszenzfähiger Substanzen wird mittels geeigneter Messvorrichtungen, wie zum Beispiel Photodioden, Photomultiplier oder CCD-Kameras, gemessen. Es ist auch möglich, den in den Wellenleiter rückgekoppelten Anteil der evaneszent angeregten Strahlung über ein diffraktives optisches Element, zum Beispiel ein Gitter, auszukoppeln und zu messen. Diese Methode ist zum Beispiel in der WO 95/33198 beschrieben.

Ein Nachteil aller oben im Stand der Technik, insbesondere in der WO 95/33197 und der WO 95/33198, beschriebenen Verfahren zur Detektion evaneszent angeregter Lumineszenz mit Dünnschichtwellenleitern liegt jedoch darin, dass auf der als

homogener Film ausgebildeten Sensorplattform jeweils nur eine Probe analysiert werden kann. Um weitere Messungen auf derselben Sensorplattform durchführen zu können, sind jedesmal aufwendige Wasch- bzw. Reinigungsschritte notwendig. Dieses gilt insbesonders, wenn ein von der ersten Messung verschiedener Analyt detektiert werden soll. Im Falle eines Immunoassays bedeutet dieses im allgemeinen, dass die gesamte immobilisierte Schicht auf der Sensorplattform ausgetauscht oder gleich eine neue Sensorplattform als ganzes verwendet werden muss. Insbesondere können also keine gleichzeitigen Bestimmungen mehrerer Analyten durchgeführt werden.

Zur gleichzeitigen oder aufeinanderfolgenden Durchführung von ausschliesslich lumineszenzbasierten Mehrfachmessungen mit im wesentlichen monomodalen, planaren anorganischen Wellenleitern sind, z. B. in der WO 96/35940, Vorrichtungen (Arrays) bekannt geworden, in denen auf einer Sensorplattform wenigstens zwei getrennte wellenleitende Bereiche angeordnet sind, die getrennt mit Anregungslicht beaufschlagt werden. Die Aufteilung der Sensorplattform in getrennte wellenleitende Bereiche hat allerdings nachteilig zur Folge, dass der Platzbedarf für diskrete Messbereiche, in diskreten wellenleitenden Bereichen auf der gemeinsamen Sensorplattform, relativ gross ist und daher nur eine verhältnismässige geringe Dichte unterschiedlicher Messbereiche (oder sogenannter "features") erreicht werden kann.

Die Verwendung des Begriffs "räumlich getrennter Messbereiche" oder "diskreter Messbereiche" im Sinne der vorliegenden Erfindung wird im späteren Abschnitt zur Beschreibung der vorliegenden Erfindung genauer definiert.

In der WO 98/22799 werden neben einer Vielzahl weiterer Vorrichtungen für die Ausgestaltung von Probenbehältnissen für Messanordnungen zur Bestimmung der im evaneszenten Feld eines planaren Wellenleiters angeregten Lumineszenz auch solche Vorrichtungen vorgeschlagen, welche der Form bekannter Mikrotiterplatten entsprechen. Die Bestimmung mehrerer Analyten durch Bindung an verschiedene innerhalb eines einzelnen Probenbehältnisse immobilisierte Erkennungelemente ist jedoch auch hier nicht vorgesehen.

In der US 5525466 und US 5738992 wird ein optischer Sensor, basierend auf Fluoreszenzanregung im evaneszenten Feld eines selbsttragender Multimode-Wellenleiters, vorzugsweise faseroptischer Art, beschrieben. Einkopplung von Anregungslicht und Auskopplung von in den Multimode-Wellenleiter rückgekoppeltem Fluoreszenzlicht erfolgen über Stirnflächenein- und -auskopplung. Das dabei detektierte Fluoreszenzsignal zum Analytnachweis ergibt sich aufgrund des Funktionsprinzips solcher Multimode-Wellenleiter als ein einziger integraler Wert für die ganze mit der Probe wechselwirkende Fläche. Vorwiegend zur Normalisierung der Signale, beispielweise zur Berücksichtigung von signalverändernden Oberflächendefekten, sind auf der Sensoroberfläche neben den biochemischen oder biologischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und Bindung eines nachzuweisenden Analyten fluoreszente Referenzmaterialien co-immobilisiert. Aufgrund des zugrunde liegenden Sensorprinzips ist jedoch keine ortsaufgelöste, sondern nur eine auf den einzelnen, integralen Messwert wirkende Normalisierung möglich. Folglich kann auch der Nachweis unterschiedlicher Analyten nur mittels Verwendung von Labeln unterschiedlicher Anregungswellenlängen oder sequentiell, nach Entfernung vorangehend gebundener Analyten, erfolgen. Aus diesen Gründen erscheinen diese Anordnungen, zusammen mit dem beschriebenen Referenzierungsverfahren, für den gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl von Analyten gar nicht oder nur wenig geeignet.

In der US 5631170 und in der EP-A-093613 werden verschiedene Methoden zur Referenzierung, insbesondere für Sensoren basierend auf Fluoreszenzanregung im evaneszenten Feld optischer Wellenleiter, diskutiert. In der EP-A-093613 wird eine Methode zur Referenzierung im Nachbargebiet zum "Messbereich" beschrieben. Insbesondere wird hierin die Notwendigkeit betont, auf einer Sensorplattform Referenz- und Meßsignale aus den gleichen Bereichen (auf dem Sensor) zu verwenden. Als eine mögliche Realisierung werden kinetische (zeitaufgelöste) Messungen genannt, da die Kinetik der Analytbindung nicht abhängig ist von den physikalischen Wellenleiterparametern und möglichen Defekten, welche sich lokal auf die Signale

auswirken. Als nachteilig für die kinetische Methode wird jedoch deren Abhängigkeit von äusseren Parametern wie Temperatur und Viskosität der individuellen Probe benannt. In der US 5631170 wird die Referenzierung mittels co-immobilisierter Fluorophore beschrieben, welche ein von der Analytkonzentration unabhängiges Referenzsignal erzeugen. Es wird bevorzugt, dass die spezifischen Erkennungselemente zur Analytbindung und die zur Referenzierung eingesetzten co-immobilisierten Fluorophore in statistischer Mischung auf der Sensorplattform vorliegen. Weiterhin wird anhand des Ausführungsbeispiels einer "Capillary-Fill-Device" (CFD) eine Methode zur simultanen Kalibration vorgestellt, indem (beispielsweise in einem kompetitiven Assay-Format) in lokalen Zonen der CFD zusätzlich zur Probe bekannte Mengen des Analyten eingesetzt werden, beispielsweise indem sie durch Zugabe der Probe aus (beispielsweise der Sensoroberfläche gegenüberliegenden) dafür vorgesehenen Reagentienbehältnissen gelöst werden.

In der WO 97/35181 werden Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung einer oder mehrerer Analyten beschrieben, indem in einem im Wellenleiter ausgebildeten "Well" Patches mit unterschiedlichen Erkennungselementen aufgebracht sind, welche mit einer einen oder mehrere Analyten enthaltenden Probenlösung kontaktiert werden. Zu Kalibrationszwecken werden gleichzeitig Lösungen mit definierten Analytkonzentrationen in weitere Wells mit gleichartigen Patches gegeben. Als Beispiel werden je 3 Wells (zur Messung mit Kalibrationslösungen niedriger und hoher Analytkonzentration sowie der aktuellen Probe) mit diskreten und von Patch zu Patch verschiedenen immobilisierten Erkennungselementen zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyten vorgestellt. Hinweise auf ortsaufgelöste Referenzierungen werden nicht gegeben.

In Analytical Chemistry, Vol. 71 (1999), 4344 – 4352 wird ein Multianalyt-Immunoassay auf einem Silicium-Nitrid-Wellenleiter vorgestellt. Es werden bis zu drei Analyten gleichzeitig, auf drei kanalförmig ausgebildeten Erkennungsbereichen (Messbereichen) mit jeweils unterschiedlichen biologischen Erkennungselementen, beschrieben. Analyten und Tracer-Antikörper werden als Mischung in eine die drei Messfelder überdeckende Probenzelle gegeben. Der Background wird jeweils zuvor mit einer spezifisch dafür

hergestellten Lösung ohne Analyt gemessen. Aus der Beschreibung ist nicht ersichtlich, ob die Background-Bestimmung ortsaufgelöst oder summarisch für die verschiedenen Messbereiche durchgeführt wird. Da eine Regenerierung der Sensorplattform nicht vorgenommen wird, müssen zur Erstellung einer Kalibrationskurve eine Vielzahl von Einzelmessungen mit immer wieder neuen Sensorplattformen durchgeführt werden. Dieses, durch die nur geringe Anzahl von Messfeldern auf einer Sensorplattform sowie durch das Assay-Design bedingte Vorgehen, ist als nachteilig anzusehen, da die Genauigkeit durch die Verwendung unterschiedlicher Sensorplattformen verringert wird und die Dauer des Verfahrens sich deutlich verlängert.

In Analytical Chemistry, Vol. 71 (1999), 3846 – 3852 wird ebenfalls ein Multianalyt-Assay zur gleichzeitigen Bestimmung dreier verschiedener Analyten vorgestellt. Als Beispiel gleichzeitig zu bestimmender Analyten aus den Gruppen Bakterien, Viren und Proteine werden *Bacillus globigii*, MS2-Bakteriophagen und "Staphylococcal enterotoxin B" benutzt, wobei in jeweils zwei zueinander parallelen Reihen (Kanälen) Antikörper gegen diese Analyten auf einem als (selbsttragendem Multimode-) Wellenleiter dienendem Glasplättchen immobilisiert wurden. In dem nachfolgend beschriebenen Multianalyt-Assay wird eine Flusszelle mit zu den immobilisierten Reihen von Erkennungselementen gekreuzten Fliesskanälen auf das Glasplättchen aufgesetzt. Die Sandwich-Immunoassays werden unter sequentieller Zugabe von Waschlösung (Puffer), Probe mit einem oder mehreren Analyten, Waschlösung (Puffer), Tracer-Antikörper (einzeln oder als Cocktail) und Waschlösung (Puffer) durchgeführt. Die lokal gemessenen Fluoreszenzintensitäten werden korrigiert mittels Subtraktion des neben den Messfeldern beobachteten Hintergrundsignals. Hinweise auf eine Berücksichtigung lokaler Variationen der Anregungslichtintensität werden auch hier nicht gegeben. Auch diese Anordnung ermöglicht jedoch nicht, eine ganze Messreihe zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyten, zusammen mit den notwendigen Kalibrationen, durchzuführen, sondern erfordert dafür entweder die Verwendung mehrerer verschiedener Sensorplattformen oder repetitive, sequentielle Messungen auf einer Plattform mit zwischenzeitlicher Regenerierung, was besonders im Falle von Immunoassays in vielen Fällen nur in begrenztem Umfang möglich ist.

In BioTechniques 27 (1999), 778 – 788 wird eine Anordnung von 96 Wells mit jeweils 4 Arrays aus 36 Spots (d.h. insgesamt 144 Spots pro Well) auf der Grundfläche einer Standard-Mikrotiterplatte (ca. 8 cm x 12 cm), zur Entwicklung von ELISAs (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) basierend auf Mikroarrays, vorgestellt. Für Zwecke der Positionierung sowie der Kontrolle der Wirksamkeit der eingesetzten Reagentien beim enzymatischen Detektionsschritt des Assays mittels Zugabe von fluoreszentem "Alkaline phosphatase substrate" (ELF®) werden von den 6x6 Arrays jeweils eine Reihe und eine Spalte für "biotinylierte BSA-Marker" reserviert. – Diese Anordnung deutet zwar eine Möglichkeit zu einer deutlichen Erhöhung des Durchsatzes mit klassischen Assays (ELISAs) an, die demonstrierte Empfindlichkeit (13.4 ng/ml rabbit IgG) erscheint jedoch unbefriedigend.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bis jetzt keine gemeinsame Lösung der folgenden Aufgabenstellungen bereitgestellt wurde, die für einen schnellen hochempfindlichen gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl von (d. h. drei oder mehr) Analyten bestehen:

- Gleichzeitige Bestimmung mehrerer Analyten auf einer Sensorplattform mit Nachweisgrenzen im pikomolaren Bereich
- Möglichst einfache Assay-Durchführung zur Minimierung der Anforderungen an die Fluidik (z. B. durch gleichzeitige Zugabe von Mischungen aus einer Probe mit mehreren nachzuweisenden Analyten und mehreren Tracer-Molekülen)
- Örtlich aufgelöste Referenzierung zwecks Berücksichtigung von örtlichen Variationen der Anregungslichtintensität
- Gegebenenfalls gleichzeitige Durchführung von Kalibrationsmessungen auf derselben Sensorplattform.

Gegenstand der Erfindung ist ein Kit zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend

- eine Sensorplattform umfassend einen optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in der Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c) zur Einkopplung besagten Anregungslights in die Schicht (a),
- mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt auf oder über eine Haftvermittlungsschicht auf der Schicht (a) immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und / oder Bindung besagter Analyten und / oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten,
- Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität sowie gegebenenfalls
- Vorkehrungen zur Kalibration einer oder mehrerer infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen,

wobei eine auf besagte Analyten zu untersuchende flüssige Probe entweder direkt oder nach Mischung mit weiteren Reagentien mit besagten Messbereichen auf besagter Sensorplattform in Kontakt gebracht wird.

Mit dem erfindungsgemäßen Kit kann die beschriebene Problemstellung gelöst werden. Überraschend wurde dabei festgestellt, dass es, unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Kits, möglich ist, in Multianalyt-Assays, zur gleichzeitigen Bestimmung mehrerer Analyten in einer Probe, eine ähnlich hohe Empfindlichkeit und Reproduzierbarkeit zu erzielen wie bisher in einer entsprechenden Anzahl von Einzelassays zum Nachweis der individuellen Analyten.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung sollen räumlich getrennte oder diskrete Messbereiche (d) durch die geschlossene Fläche definiert werden, die dort immobilisierte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente zur Erkennung

eines Analyten aus einer flüssigen Probe einnehmen. Diese Flächen können dabei eine beliebige Geometrie, beispielsweise die Form von Punkten, Kreisen, Rechtecken, Dreiecken, Ellipsen oder Linien, haben.

Unter dem Begriff "optische Transparenz" wird nachfolgend verstanden, dass das durch diese Eigenschaft gekennzeichnete Material zumindest bei einer oder mehreren zur Anregung einer oder mehrerer Lumineszenzen benutzten Anregungswellenlängen weitgehend transparent und damit absorptionsfrei sein sollte.

Bei einer gegebenen Schichtdicke der optisch transparenten Schicht (a) ist die Empfindlichkeit einer erfindungsgemässen Anordnung um so grösser, je höher der Unterschied des Brechungsindex der Schicht (a) zu den Brechungsindices der umgehenden Medien ist, d.h. je höher der Brechungsindex der Schicht (a) ist. Es wird bevorzugt, dass der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist.

Eine weitere wichtige Anforderung an die Eigenschaften der Schicht (a) besteht darin, dass die Ausbreitungsverluste darin geführten Lichts möglichst niedrig sind. Es wird bevorzugt, dass die erste optisch transparente Schicht (a) ein Material aus der Gruppe von  $TiO_2$ ,  $ZnO$ ,  $Nb_2O_5$ ,  $Ta_2O_5$ ,  $HfO_2$ , oder  $ZrO_2$ , besonders bevorzugt aus  $TiO_2$  oder  $Ta_2O_5$  oder  $Nb_2O_5$  umfasst. Es können auch Kombinationen mehrerer derartiger Materialien verwendet werden.

Bei gegebenem Material der Schicht (a) und gegebenem Brechungsindex ist die Empfindlichkeit bis zu einem unteren Grenzwert der Schichtdicke umso grösser, je geringer die Schichtdicke ist. Der untere Grenzwert wird bestimmt durch den Abbruch der Lichtleitung bei Unterschreiten eines von der Wellenlänge des zu führenden Lichts abhängigen Werts sowie einem zu beobachtenden Anstieg der Ausbreitungsverluste bei sehr dünnen Schichten mit weiterer Schichtdickenabnahme. Es ist von Vorteil, wenn das Produkt aus der Dicke der Schicht (a) und ihrem Brechungsindex ein Zehntel bis ein

Ganzes, bevorzugt ein Drittel bis zwei Drittel, der Anregungswellenlänge eines in die Schicht (a) einzukoppelnden Anregungslichts beträgt.

Die optisch transparente Schicht (b) sollte absorptions- und fluoreszenzarm, im Idealfall absorptions- und fluoreszenzfrei sein. Außerdem sollte die Oberflächenrauhigkeit niedrig sein, da sich die Oberflächenrauhigkeit der Schicht (b) bei Abscheidung einer weiteren Schicht (a) mit höherem Brechungsindex, welche als wellenleitende Schicht vorgesehen ist, in Abhängigkeit vom Abscheidungsprozess in mehr oder minder starkem Maße auf die Oberflächenrauhigkeit der Schicht (a) auswirkt. Eine erhöhte Oberflächenrauhigkeit an den Grenzschichten der Schicht (a) führt zu erhöhten Streuverlusten des geführten Lichts, was jedoch unerwünscht ist. Diese Anforderungen werden durch eine Reihe von Materialien erfüllt. Es wird bevorzugt, dass das Material der zweiten optisch transparenten Schicht (b) Silikate, z. B. Glas oder Quarz, oder einen transparenten thermoplastischen oder spritzbaren Kunststoff, beispielsweise aus der Gruppe umfasst, die von Polycarbonat, Polyimid, Acrylat, insbesondere Polymethylmethacrylat, oder Polystyrol gebildet wird.

Es wird bevorzugt, dass in der Schicht (a) modulierte Gitterstrukturen (c) eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweisen und ihre Modulationstiefe 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 50 nm beträgt. Dabei wird bevorzugt, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,4 ist.

Die Gitterstruktur kann in verschiedener Form gestaltet sein. Es wird bevorzugt, dass die Gitterstruktur (c) ein Reliefgitter mit beliebigem Profil, beispielsweise mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil, oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) ist.

In einer Ausführungsform der Anordnung wird bevorzugt, dass die Gitterstruktur (c) ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode ist.

Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise um gleichzeitig Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge einzukoppeln, kann es jedoch von Vorteil sein, wenn die Gitterstruktur (c) ein multidiffraktives Gitter ist.

Für bestimmte Ausführungsformen wird bevorzugt, dass die Gitterstruktur (c) eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweist.

Für eine Vielzahl von Ausführungsformen wird bevorzugt, dass die Sensorplattform gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.

Generell gilt, dass Gitterstrukturen (c) der Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d) und / oder der Auskopplung von in die Schicht (a) rückgekoppeltem Lumineszenzlicht dienen können. In genereller Form wird die Sensorplattform daher eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit optional daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfassen.

In den Assay-Applikationen mit einem erfindungsgemässen Kit ist es im allgemeinen vorteilhaft, ein geeignetes Anregungslicht über eine Gitterstruktur (c) einzukoppeln, an welche sich in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Lichts ein unmodulierter Bereich der Schicht (a) mit einer darauf befindlichen Vielzahl von Messbereichen in einem Array anschliesst, auf denen der Nachweis der verschiedenen Analyten erfolgt. Daran wird sich in der Ausbreitungsrichtung des geführten Lichts vorteilhaft eine weitere Gitterstruktur mit einem dahinter befindlichen weiteren Array von Messbereichen anschliessen etc. Nach Durchlaufen eines unmodulierten Bereichs wird das in der Schicht (a) geführte Licht jeweils wieder ausgekoppelt. In der zur Ausbreitungsrichtung des geführten Lichts senkrechten Richtung (d.h. parallel zu den Gitterlinien) werden sich weitere Arrays von Messbereichen

anschliessen. Daher wird bevorzugt, dass jedem in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslights nachfolgenden Array von Messbereichen eine für dieses Array spezifische Gitterstruktur (c) zur Auskopplung dieses Anregungslights zugeordnet ist, wobei senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslights die Gitterstrukturen spezifisch für einzelne Arrays ausgebildet sein können oder sich auch über die ganze Sensorplattform in dieser Richtung erstrecken können. Dieses bedeutet also, dass das Einkoppelgitter eines in Ausbreitungsrichtung eines in der Schicht (a) einer Sensorplattform geführten Anregungslights nachfolgenden Arrays als Auskoppelgitter für das am Einkoppelgitter des in besagter Ausbreitungsrichtung vorangehenden Arrays eingekoppelte Anregungslight dient.

Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise für den Einsatz von 2 oder mehr Lumineszenzlabeln mit unterschiedlichen Anregungswellenlängen, ist es von Vorteil, wenn die Sensorplattform eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien umfasst, welche der Einkopplung von Anregungslight unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.

Die Unterteilung der Sensorplattform in Bereiche mit darin ausgebildeten Gitterstrukturen und sich daran anschliessenden unmodulierten Bereichen bedeutet für die Anwendung, dass der Platzbedarf für ein einzelnes Array von Messbereichen zwischen aufeinander folgenden Gitterstrukturen (einschliesslich mindestens einer zugeordneten Gitterstruktur) ein gewisses Minimum nicht unterschreiten kann, welches bei den gegenwärtigen technischen Möglichkeiten zur Erzeugung der Gitterstrukturen sowie zur Einkopplung eines geeigneten Anregungslichtbündels in der Grössenordnung von etwa  $0.1 \text{ mm}^2$  bis  $1 \text{ mm}^2$  liegt. Daher ist es insbesondere für Anordnungen, in denen eine Vielzahl jeweils kleinflächiger Arrays erwünscht ist, von Vorteil, wenn eine Gitterstruktur (c) oder eine Überlagerung mehrerer Gitterstrukturen in der Schicht (a) im wesentlichen über die gesamte Fläche der Sensorplattform moduliert ist.

In einer speziellen Form der Erfindung wird bevorzugt, dass auf der Sensorplattform optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems aufgebracht sind.

Sofern eine Eigenfluoreszenz der Schicht (b) nicht auszuschliessen ist, insbesondere wenn diese aus einem Kunststoff wie beispielsweise Polycarbonat besteht, oder auch um den Einfluss der Oberflächenrauhigkeit der Schicht (b) auf die Lichtleitung in der Schicht (a) zu vermindern, kann es von Vorteil sein, wenn zwischen den Schichten (a) und (b) eine Zwischenschicht aufgebracht ist. Daher besteht eine weitere Ausführungsform der erfindungsgemässen Anordnung darin, dass sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm - 10000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet.

Die einfachste Form der Immobilisierung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente besteht in physikalischer Adsorption, beispielsweise infolge hydrophober Wechselwirkungen zwischen den Erkennungselementen und der Grundplatte. Diese Wechselwirkungen können jedoch durch die Zusammensetzung des Mediums und dessen physikalisch-chemische Eigenschaften, wie beispielsweise Polarität und Ionenstärke, in ihrem Ausmass stark verändert werden. Insbesondere im Falle sequentieller Zugabe verschiedener Reagentien in einem mehrstufigen Assay ist das Haftvermögen der Erkennungselemente nach rein adsorptiver Immobilisierung auf der Oberfläche oft unzureichend. In einer bevorzugten Form des erfindungsgemässen Kits wird das Haftvermögen dadurch verbessert, dass zur Immobilisierung biologischer oder biochemischer oder synthetischer Erkennungselemente auf der Sensorplattform eine Haftvermittlungsschicht (f) aufgebracht ist. Die Haftvermittlungsschicht kann dabei auch, insbesondere im Falle zu immobilisierender biologischer oder biochemischer Erkennungselemente, der Verbesserung der "Biokompatibilität" dienen, d.h. der Erhaltung der Bindungsfähigkeit, im Vergleich zu deren Ausmass in natürlicher

biologischer oder biochemischer Umgebung, und insbesondere der Vermeidung einer Denaturierung. Es wird bevorzugt, dass die Haftvermittlungsschicht (f) eine Stärke von weniger als 200 nm, vorzugsweise von weniger als 20 nm, hat. Für die Herstellung der Haftvermittlungsschicht eignen sich eine Vielzahl von Materialien. Ohne jegliche Einschränkung wird bevorzugt, dass die Haftvermittlungsschicht (f) eine oder mehrere chemische Verbindungen aus den Gruppen umfasst, die Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte passive oder funktionalisierte Mono- oder Doppelschichten" umfassen.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt des erfindungsgemäßen Kits ist, dass die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente in räumlich getrennten Messbereichen (d) immobilisiert sind. Diese räumlich getrennten Messbereiche (d) können durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf der Sensorplattform erzeugt werden. Für die Aufbringung eignen sich eine Vielzahl bekannter Verfahren. Ohne Beschränkung der Allgemeinheit wird bevorzugt, dass zur Aufbringung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente auf der Sensorplattform eines oder mehrere Verfahren verwendet werden aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting", mechanischem Spotting mittels Stift, Feder oder Kapillare, "micro contact printing", fluidischer Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen, sowie photochemischen und photolithographischen Immobilisierungsverfahren gebildet werden.

Als besagte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente können Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotiden) oder Nukleinsäure-Analogen (z.B. PNA), mono- oder polyklonalen Antikörpern, Aptameren, synthetischen Peptidstrukturen, löslichen, membrangebundenen und aus einer Membran isolierten Proteinen wie beispielsweise Rezeptoren, deren Liganden, Antigenen für Antikörper, 'Histidin-Tag-

Komponenten" und deren Komplexbildungspartnern, durch chemische Synthese erzeugten Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, gebildet wird. Es ist auch vorgesehen, dass als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente ganze Zellen, Zellbestandteile, Zellmembranen oder deren Fragmente aufgebracht werden.

Eine weitere spezielle Form des erfindungsgemässen Kits besteht darin, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Größenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

Für verschiedene Anwendungen wird bevorzugt, dass Arrays von Messbereichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Messbereichen zur Referenzierung, d.h. Bestimmung physikalischer Parameter und / oder chemischer Unterschiede zwischen verschiedenen aufgebrachten Proben. Dabei können ein oder mehrere Arrays Segmente von zwei oder mehr Messbereichen mit innerhalb des Segments gleichartigen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur Analytbestimmung oder Referenzierung umfassen. Ein Segment kann aber auch mehrere diskrete Messbereiche mit voneinander unterschiedlichen Erkennungselementen enthalten.

Eine mögliche Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Segmente eines Arrays oder ein oder mehrere Arrays der Bestimmung von Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise mit immobilisierten Anti-Zytokin-Antikörpern zur Bestimmung unterschiedlicher Zytokine, zugeordnet sind. In ähnlicher Weise können ein oder mehrere Segmente eines Arrays oder ein oder mehrere Arrays der gleichzeitigen Bestimmung eines ganzen Satzes sogenannter "Markerproteine" dienen. Beispielsweise können dieses

intra- und / oder extrazellulär vorkommende körpereigene Proteine sein, welche infolge und als Anzeichen verschiedener Krankheiten, wie beispielsweise degenerative Erkrankungen, bestimmte Krebsformen oder Autoimmunerkrankungen, beispielsweise in erhöhter Konzentration auftreten.

Üblicherweise wird ein zu immobilisierendes Erkennungselement zum Nachweis eines Analyten so ausgewählt, dass es für die Erkennung und Bindung des besagten Analyten eine möglichst hohe Spezifität und Bindungsaffinität und gegenüber anderen, möglicherweise (bio)chemisch ähnlichen Analyten eine möglichst geringe Kreuzreaktivität aufweist. Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise beim Nachweis niedermolekularer Verbindungen in der Immunoanalytik oder beim Nachweis von Einzelpunktmutationen in der Nukleinsäurenanalytik, ist eine Kreuzreaktivität zu den (bio)chemisch ähnlichsten Verwandten des betreffenden Analyten kaum auszuschliessen. Für derartige Anwendungen kann eine solche Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits vorteilhaft sein, in denen ein oder mehrere Messbereiche eines Segments oder eines Arrays der Bestimmung desselben Analyten zugeordnet sind und deren immobilisierte biologische oder biochemische Erkennungselemente unterschiedlich hohe Affinitäten zu besagtem Analyten aufweisen. Die Erkennungselemente sind dabei zweckmässigerweise so ausgewählt, dass sich ihre Affinitäten zu verschiedenen, einander (bio)chemisch ähnlichen Analyten in unterschiedlicher, charakteristischer Weise ändern. Aus der Gesamtheit der Signale von verschiedenen Messbereichen mit unterschiedlichen Erkennungselementen für einen einzelnen Analyten lässt sich dann, in vergleichbarer Weise zu einem Fingerabdruck, die Identität des Analyten bestimmen.

Eine andere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Segmente eines Arrays oder ein oder mehrere Arrays der Bestimmung unterschiedlicher Gruppen von Analyten, wie beispielsweise pharmazeutischer Präparate ("Drugs") zur Behandlung einer Krankheit und / oder derer Metaboliten und / oder der Nachweissubstanzen für diese Krankheit, wie beispielsweise sogenannter "Markerproteine", zugeordnet sind.

Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, in einer einzigen Messung die Konzentration eines ganzen Satzes von "Markerproteinen", wie oben erläutert, und die Konzentration von zur Behandlung einer Krankheit verabreichten Präparaten und von deren Abbauprodukten zu bestimmen. Aus diesen Kombinationsmöglichkeiten ergibt sich ein hohes Potential beispielsweise zur Beschleunigung der pharmazeutischen Produktentwicklung oder der Patientenstratifikation zur Bestimmung einer optimalen präparativen Behandlung.

Für bestimmte Anwendungen, in denen beispielsweise Fragen der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse mit einer Vielzahl von Arrays auf einer gemeinsamen Sensorplattform im Vordergrund stehen, ist es vorteilhaft, dass zwei oder mehr Arrays eine gleichartige geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

In anderen Applikationen ist es wesentlich, die Einflüsse systematischer Fehler auf die Ergebnisse zu minimieren, wie sich diese beispielsweise durch eine Replikation gleichartiger Strukturen auf einer gemeinsamen Sensorplattform ergeben können. Beispielsweise hierfür kann es von Vorteil sein, dass zwei oder mehr Arrays eine unterschiedliche geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

Der erfindungsgemäße Kit mit einer Vielzahl von Messbereichen in diskreten Arrays, von denen ihrerseits eine Vielzahl auf einer gemeinsamen Sensorplattform angeordnet sein kann, bietet die Möglichkeit, dass unter Einsatz relativ geringer Mengen von Probelösungen, Reagentien oder gegebenenfalls Kalibrationslösungen auf ein- und derselben Plattform, unter weitestgehend identischen Bedingungen, auch viele Arten von Duplikationen oder Mehrfachausführungen gleichartiger Messungen durchgeführt werden können. Damit können beispielsweise in einer einzigen Messung statistische Daten erzeugt werden, wofür herkömmlicherweise eine Vielzahl von Einzelmessungen mit entsprechend längerer Gesamt-Messzeit und höherem Verbrauch an Proben- und Reagentienmengen erforderlich ist. Es wird bevorzugt, dass für den Nachweis jedes Analyten oder zur physikalischen oder chemischen Referenzierung jeweils 2 oder mehr

identische Messbereiche innerhalb eines Segments oder Arrays vorgesehen sind. Dabei können beispielsweise besagte identische Messbereiche in einer durchgehenden Reihe oder Spalte oder Diagonalen eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sein. Die Aspekte der Referenzierung können physikalische oder chemische Parameter der Sensorplattform betreffen, wie beispielsweise lokale Unterschiede der Anregungslichtintensität (siehe hierzu auch weiter unten), als auch Einflüsse der Probe, wie beispielsweise deren pH, Ionenstärke, Brechungsindex, Temperatur etc.

Für andere Applikationen kann es aber auch vorteilhaft sein, wenn besagte identische Messbereiche statistisch innerhalb eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.

Die immobilisierten Erkennungselemente sind im allgemeinen so ausgewählt, dass sie mit möglichst hoher Spezifität den nachzuweisenden Analyten erkennen und binden. Im allgemeinen ist jedoch zu erwarten, dass auch eine unspezifische Anlagerung von Analytmolekülen an die Oberfläche der Grundplatte stattfindet, insbesondere wenn zwischen den in den Messbereichen immobilisierten Erkennungselementen noch reaktive Freistellen vorhanden sind. Es wird daher bevorzugt, dass Bereiche zwischen den räumlich getrennten Messbereichen zur Minimierung unspezifischer Bindung von Analyten oder deren Nachweissubstanzen "passiviert werden", d.h. dass zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten "chemisch neutrale" Verbindungen aufgebracht sind, vorzugsweise beispielsweise bestehend aus den Gruppen, die von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifischen, polyklonalen oder monoklonalen, artfremden oder empirisch für den oder die nachzuweisenden Analyten unspezifischen Antikörpern (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 –, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierender, fragmentierter natürlicher oder synthetischer DNA, wie beispielsweise ein Extrakt von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladenen, aber hydrophilen Polymeren, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, gebildet werden.

Wie vorangehend beschrieben, ist für viele, wenn nicht sogar die Mehrzahl von Applikationen eine solche Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kits von Vorteil, in denen eine Haftvermittlungsschicht vor der Immobilisierung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungslemente auf der Sensorplattform aufgebracht wurde. Dabei werden solche Ausführungsformen bevorzugt, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass die Funktion der Passivierung von Bereichen zwischen den räumlich getrennten Messbereichen zur Minimierung unspezifischer Bindung von Analyten oder deren Nachweissubstanzen durch die Aufbringung besagter Haftvermittlungsschicht auf der Sensorplattform, ohne Aufbringung zusätzlicher Substanzen, erfüllt wird.

Der erfindungsgemäße Kit kann eine sehr grosse Anzahl einzelner Messbereiche umfassen. Es wird bevorzugt, dass in einer 2-dimensionalen Anordnung bis zu 100 000 Messbereiche angeordnet sind und ein einzelner Messbereich eine Fläche von 0.001 – 6 mm<sup>2</sup> einnimmt.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kits, in der die Oberseite der Sensorplattform mit den darauf erzeugten Messbereichen über der optisch transparenten Schicht (a) mit einem weiteren Körper derart zusammengebracht ist, dass zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und besagtem Körper eine oder mehrere räumliche Aussparungen zur Erzeugung eines oder mehrerer gegeneinander fluidisch abgedichteter Probenbehältnisse erzeugt werden, in denen jeweils ein oder mehrere Messbereiche oder Segmente oder Arrays von Messbereichen liegen. Als besagter mit der Sensorplattform zusammenzubringender Körper werden dabei erfindungsgemäß nicht nur selbsttragende Strukturen verstanden, sondern auch beispielsweise aufgetragene strukturierte Beschichtungen von gegebenfalls nur einigen Mikrometern Stärke, die, unter den Verwendungsbedingungen des Kits, ein Übertreten von Flüssigkeit von in einem so erzeugten (in diesem Fall typischerweise offenen) Probenbehältnis in ein benachbartes Probenbehältnis verhindern.

Eine andere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse als gegeneinander fluidisch abgedichtete Flusszellen mit jeweils mindestens einem Zulauf und mindestens einem Ablauf ausgebildet sind und gegebenenfalls zusätzlich mindestens ein Ablauf jeder Flusszelle in ein mit dieser Flusszelle fluidisch verbundenes Reservoir führt, welches aus der Flusszelle austretende Flüssigkeit aufnimmt.

Vorteilhafterweise ist dabei das gegebenenfalls zusätzlich vorhandene Reservoir zur Aufnahme aus der Flusszelle austretender Flüssigkeit als eine Vertiefung in der Aussenwand des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers ausgebildet.

Für die Erzeugung der räumlichen Aussparungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper gibt es dabei verschiedene technische Möglichkeiten. In einer möglichen Anordnung sind auf der Sensorplattform als Grundplatte räumliche Strukturen im Raster des Arrays der zu erzeugenden Flusszellen ausgebildet. Diese Strukturen auf der Grundplatte können beispielsweise die Wände oder Teile der Wände, wie beispielsweise Sockel, zwischen den neben- und hintereinander angeordneten Flusszellen bilden, welche durch Zusammenbringen der Grundplatte mit einem entsprechend geformten Körper erzeugt werden. Um das Array von Flusszellen zu erzeugen, ist es auch möglich, dass zur Erzeugung der räumlichen Aussparungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper Ausnehmungen in der Sensorplattform ausgebildet sind.

Eine weitere Ausführungsform besteht darin, dass zur Erzeugung der Aussparungen zwischen der Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper Ausnehmungen in besagtem Körper ausgebildet sind. Für diese Ausführungsform wird bevorzugt, dass die Grundplatte im wesentlichen planar ist.

Der mit der Gundplatte zusammenzubringende Körper zur Erzeugung des Arrays von Flusszellen kann aus einem einzigen Werkstück bestehen. Eine andere Ausführungsform besteht darin, dass der mit der Grundplatte zusammengebrachte Körper aus mehreren

Teilen zusammengesetzt ist, wobei die zusammengefügten Bestandteile besagten Körpers vorzugsweise eine irreversibel zusammengefügte Einheit bilden.

Es wird bevorzugt, dass der mit der Grundplatte zusammengebrachte Körper hilfsweise Vorkehrungen umfasst, welche das Zusammenfügen besagten Körpers und der Grundplatte erleichtern.

Die Anordnung umfasst vorzugsweise eine Vielzahl, d. h. 2 – 2000 Probenbehältnisse, bevorzugt 2 – 400, besonders bevorzugt 2 – 100 Probenbehältnisse.

Beispielsweise für Anwendungen, in denen die Zugabe der Proben und / oder zusätzlicher Reagentien direkt durch einen Dispenser erfolgen soll, wird bevorzugt, dass die Probenbehältnisse auf der den Messbereichen gegenüberliegenden Seite des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers offen sind.

Bevorzugt wird, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen und / oder Spalten) der Probenbehältnisse dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.

Eine weitere Ausführungsform der Anordnung von Probenbehältnissen als Teil des erfindungsgemäßen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass sie durch einen zusätzlichen Abschluss, beispielsweise eine Folie, Membran oder eine Deckplatte, abgeschlossen wird.

Durch Variation der Grundflächen und der Tiefe der Ausnehmungen kann die Aufnahmefähigkeit der Flusszellen in einem weiten Bereich variiert werden, so dass das Innenvolumen jedes Probenbehältnisses typischerweise 0.1  $\mu$ l – 1000  $\mu$ l, bevorzugt 1  $\mu$ l – 20  $\mu$ l beträgt. Dabei können die Innenvolumina verschiedener Flusszellen einer Anordnung gleich oder unterschiedlich sein.

Es wird bevorzugt, dass die Tiefe der Ausnehmungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengefügten Körper 1 – 1000  $\mu$ m, besonders bevorzugt 20 – 200  $\mu$ m beträgt. Die Grösse der Ausnehmungen eines Arrays kann

einheitlich oder unterschiedlich sein, und die Grundflächen können beliebige, vorzugsweise rechteck- oder polygonförmige oder auch andere Geometrie haben. Ebenso können die lateralen Abmessungen der Grundflächen in einem weiten Bereich variiert werden, wobei typischerweise die Grundflächen der Ausnehmungen zwischen der Grundplatte und dem damit zusammengefügten Körpers jeweils  $0.1 \text{ mm}^2 - 200 \text{ mm}^2$ , bevorzugt  $1 \text{ mm}^2 - 100 \text{ mm}^2$  betragen. Es wird bevorzugt, dass die Ecken der Grundflächen abgerundet sind. Abgerundete Ecken wirken sich günstig auf das Strömungsprofil aus und erleichtern die Entfernung eventuell gebildeter Gasblasen aus den Flusszellen bzw. verhindern deren Entstehen.

Für die gleichzeitige Proben- oder Reagentienzugabe zu einer Vielzahl von Probenbehältnissen können Multikanalpipettoren für manuelle oder automatische Reagentienapplikation verwendet werden, bei denen die individuellen Pipetten in ein- oder zweidimensionalen Arrays angeordnet sind, sofern die Anordnung von Probenbehältnissen als Teil des erfindungsgemäßen Kits die Zuläufe in dem entsprechenden Raster aufweist. Bevorzugt entspricht daher das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen und Spalten) der Anordnung dem Raster der Wells von Standardmikrotiterplatten. Als industrieller Standard ist dabei eine Anordnung von  $8 \times 12$  Wells mit einem (Zentrum-zu-Zentrum) Abstand von ca. 9 mm etabliert. Hiermit kompatibel sind kleinere Arrays mit beispielsweise 3, 6, 12, 24 und 48 Wells in gleichem Abstand. Es können auch mehrere erfindungsgemäße Anordnungen von Probenbehältnissen mit solchen kleineren Arrays von Flusszellen derart zusammengefügt werden, dass die einzelnen Zuläufe besagter Flusszellen in einem ganzzahligen Vielfachen des Abstands von ca. 9 mm angeordnet sind.

Seit einiger Zeit werden auch Platten mit 384 und 1536 Wells, als ganzzahligem Vielfachen von 96 Wells auf gleicher Grundfläche mit entsprechend reduziertem Wellabstand, verwendet, welche ebenfalls als Standardmikrotiterplatten bezeichnet werden sollen. Durch die Anpassung des Rasters der Probenbehältnisse der erfindungsgemäßen Anordnung, mit den Zu- und Abläufen jedes Probenbehältnisses, an

diese Standards können eine Vielzahl kommerziell eingeführter und erhältlicher Labor-Pipettoren und -Roboter für die Probenzugabe verwendet werden.

Bevorzugt entsprechen die äusseren Grundabmessungen der Anordnung von Probenbehältnissen, als Teil des erfindungsgemässen Kits, den Grundabmessungen dieser Standard-Mikrotiterplatten.

Eine weitere spezielle Form der Erfindung ist eine Anordnung von beispielsweise 2 bis 8 Probenbehältnissen als Teil des erfindungsgemässen Kits, mit den vorgängig genannten Eigenschaften, in einer Spalte oder beispielsweise 2 bis 12 Probenbehältnissen in einer Zeile, welche ihrerseits mit einem Träger ("Metaträger") mit den Abmessungen von Standardmikrotiterplatten derart zusammengefügt werden, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen oder Spalten) der Zuläufe der Probenbehältnisse dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.

Das Zusammenfügen der Anordnung der Probenbehältnisse mit dem Metaträger kann beispielsweise durch Kleben oder durch genaue Anpassung ohne Kleben erfolgen, wenn er für den einmaligen Gebrauch vorgesehen ist, oder beispielsweise durch Einklinken oder Einschieben in eine geeignet ausgebildete Halterung, wenn er für mehrfachen Gebrauch vorgesehen ist. Das Material des Metaträgers kann, beispielsweise, ausgewählt sein aus der Gruppe, die von form-, spritz- oder fräsbaren Kunststoffen, Metallen, Silikaten, wie zum Beispiel Glas, Quarz oder Keramiken gebildet wird.

Es können auch mehrere solche Spalten oder Zeilen von Probenbehältnissen mit einem einzigen derartigen Metaträger so zusammengefügt werden, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen oder Spalten) der Zuläufe der Flusszellen dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte, d. h. einem ganzzahligen Vielfachen von 9 mm (entsprechend 96-Well-Platte) oder von 4.5 mm (entsprechend 384-Well-Platte, siehe oben) oder von 2.25 mm (entsprechend 1536-Well-Platte, siehe oben) entspricht.

Die Anordnung von Probenbehältnissen kann jedoch selbstverständlich auch in einem anderen Raster ausgebildet sein.

Die Materialien für den mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körper und einer gegebenenfalls verwendeten zusätzlichen Deckplatte müssen den Anforderungen für den jeweils geplanten Einsatz der Anordnung genügen. In Abhängigkeit von der spezifischen Applikation betreffen diese Anforderungen chemische und physikalische Beständigkeit, zum Beispiel gegen saure oder basische Medien, Salze, Alkohole oder Detergentien als Bestandteile von wässrigen Lösungen, oder Formamid, Temperaturbeständigkeit (zum Beispiel zwischen -30°C und 100°C), möglichst ähnliche thermische Ausdehnungskoeffizienten von Grundplatte und damit zusammengebrachtem Körper, optische Eigenschaften (z. B. Fluoreszenzfreiheit, Reflexionsvermögen), mechanische Bearbeitbarkeit etc. Es wird bevorzugt, dass das Material des mit der Grundplatte zusammengebrachten Körpers sowie eines optionalen zusätzlichen Abschlusses aus derselben Gruppe wie das Material des "Metaträgers" ausgewählt ist. Dabei können die genannten Komponenten (mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengefügter Körper, Deckplatte) jeweils aus einem einheitlichen Material bestehen als auch eine Mischung oder schichtweise oder laterale Zusammenfügung verschiedener Materialien umfassen, wobei die Materialien sich gegenseitig ersetzen können.

Ein äusserst wesentlicher Aspekt der vorliegenden Erfindung kommt den Möglichkeiten zur ortsaufgelösten Referenzierbarkeit der verfügbaren Anregungslichtintensität zu. In herkömmlichen Anordnungen, mit Einstrahlung eines Anregungslichts in einer Auflicht- oder Transmissionsbeleuchtung, werden die verfügbaren Anregungslichtintensitäten einer beleuchteten Fläche im wesentlichen durch die Anregungslichtdichte im Querschnitt des Anregungslichtbündels bestimmt. Lokale Variationen in den Eigenschaften der beleuchteten Fläche (wie beispielsweise einem Glasplättchen) haben hier nur einen zweitrangigen Einfluss. In der Anordnung des erfindungsgemässen Kits jedoch sind lokale Variationen der physikalischen Parameter der Sensorplattform, wie beispielsweise die Einkoppeleffizienz der Gitterstruktur (c) zur Einkopplung des Anregungslichts in die optisch transparente Schicht (a), oder lokale Variationen der Ausbreitungsverluste eines

geführten Modes in der optisch transparenten Schicht (a), von entscheidender Bedeutung. Ein weiterer wichtiger Gegenstand der Erfindung sind daher Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Kits, welche dadurch gekennzeichnet sind, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Anregungswellenlänge umfassen. Hierbei wird vorausgesetzt, dass die Streulichtverluste im wesentlichen proportional zur lokal geführten Lichtintensität sind. Die Streulichtverluste werden vorwiegend bestimmt durch die Oberflächenrauhigkeit und Homogenität der optisch transparenten Schicht (a) und des darunter befindlichen Substrats (optisch transparente Schicht (b)). Insbesondere ermöglicht diese Art der Referenzierung, eine Reduzierung der lokal verfügbaren Anregungslichtintensität in dessen Ausbreitungsrichtung zu berücksichtigen, wenn diese beispielsweise durch eine Absorption von Anregungslicht durch eine hohe lokale Konzentration im evaneszenten Feld der Schicht (a) befindlicher, bei der Anregungswellenlänge absorbierender Moleküle erfolgte.

Die Annahme der Proportionalität des abgestrahlten Streulichts zur Intensität des geführten Lichts gilt jedoch nicht an den Stellen, in denen eine Abstrahlung / Auskopplung durch lokale, in Kontakt mit der Schicht (a) stehende makroskopische Streuzentren erfolgt. An diesen Stellen ist das abgestrahlte Streulicht deutlich überproportional im Verhältnis zum geführten Licht. Daher ist es auch vorteilhaft, wenn die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Lumineszenzwellenlänge umfassen. Beide Methoden können selbstverständlich auch miteinander kombiniert werden. Bei der Erstellung eines Referenzbildes sollten unterschiedliche Einflüsse der Abbildungsoptik auf die Erfassung der Messsignale ausgeschlossen werden. Daher wird bevorzugt, dass die Erstellung des Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts über denselben optischen Weg wie die Erfassung der von den Messbereichen ausgehenden Lumineszenzen erfolgt.

Eine andere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei einer anderen Anregungswellenlänge als zur Anregung einer Lumineszenz umfassen. Dabei wird bevorzugt, dass eine solche Anregungswellenlänge ausgewählt wird, bei der im Laufe des Verfahrens zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten oder zu Zwecken der Referenzierung oder Kalibration eingesetzte lumineszenzfähige Moleküle keine oder nur eine möglichst geringe Absorption aufweisen, so dass Effekte des "photochemischen Ausbleichens" vermieden oder minimiert werden können.

Weiterhin wird bevorzugt, dass die Ortsauflösung des Bildes zur Referenzierung des von der Sensoplattform abgestrahlten Anregungslichts auf der Sensorplattform besser als 100  $\mu\text{m}$ , bevorzugt besser als 20  $\mu\text{m}$  beträgt. Es wird ausserdem bevorzugt, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die Bestimmung des Hintergrundsignals bei der jeweiligen Lumineszenzwellenlänge neben oder zwischen den Messbereichen umfassen.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits ist dadurch gekennzeichnet, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität mittels "Lumineszenzmarker-Spots", d.h. Bestimmung der Lumineszenzintensität aus Messbereichen mit präimmobilisierten (d.h. vor der Zugabe einer Probe bereits in diesen Messbereichen aufgebrachten) lumineszenzmarkierten Molekülen, erfolgt. Dabei wird bevorzugt, dass die "Lumineszenzmarker-Spots" in einem Raster aufgebracht sind, das die ganze Sensorplattform überspannt.

Für die Signaldetektion werden, wie nachfolgend noch genauer ausgeführt, bevorzugt ortsauflösende Detektoren, wie beispielsweise CCD-Kameras verwendet. Diese sind dadurch gekennzeichnet, dass ihre photosensitiven Elemente (Pixels) ein bestimmtes (vor allem thermisch bedingtes) Hintergrundsignal aufweisen, was die untere Schwelle der

Detektion eines lokalen Lichtsignals bestimmt, und auch eine Maximalkapazität (Sättigung) zur Detektion hoher Lichtintensitäten besitzen. Die Differenz zwischen diesen Schwellwerten bestimmt, bei einer vorgegebenen Belichtungsdauer, den dynamischen Bereich der Signaldetektion. Innerhalb dieses dynamischen Bereichs sollten sich sowohl die zu erfassenden Lumineszenzsignale zur Analytdetektion als auch die Referenzsignale bewegen. Vorteilhaft ist dabei, wenn beide Signale von gleicher Größenordnung sind, d.h. sich beispielsweise um nicht mehr als ein oder zwei Zehnerpotenzen unterscheiden. Erfindungsgemäss kann dieses beispielsweise dadurch erreicht werden, dass die Dichte der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb eines "Lumineszenzmarker-Spots" mittels Mischung mit gleichartigen, unmarkierten Molekülen bei der Immobilisierung so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzintensität aus den Bereichen der Lumineszenzmarkerspots von ähnlicher Größenordnung wie die Lumineszenzintensität der aus den für einen Analytnachweis vorgesehenen Messbereiche ist.

Die Dichte und Konzentration der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb der "Lumineszenzmarker-Spots" innerhalb eines Arrays sollen bevorzugt auf der gesamten Sensorplattform einheitlich sein.

Bei dieser Art der Referenzierung wird ihre Ortsauflösung wesentlich von der Dichte der "Lumineszenzmarker-Spots" innerhalb eines Arrays bzw. auf der ganzen Sensorplattform bestimmt. Der Abstand und / oder die Grösse verschiedener "Lumineszenzmarker-Spots" werden vorzugsweise auf die erwünschte Ortsauflösung bei der Bestimmung der Lumineszenzintensitäten aus den diskreten Messbereichen abgestimmt.

Es ist erwünscht, dass jedes Array auf der Sensorplattform mindestens einen "Lumineszenzmarker-Spot" umfasst. Vorteilhaft ist, wenn es zu jedem Segment von Messbereichen zur Bestimmung eines Analyten mindestens einen benachbarten "Lumineszenzmarker-Spot" gibt.

Für die geometrische Anordnung der "Lumineszenzmarker-Spots" innerhalb eines Arrays bzw. auf der Sensorplattform gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten. Beispielsweise besteht eine mögliche Anordnung darin, dass jedes Array eine durchgehende Reihe und / oder Spalte von "Lumineszenzmarker-Spots" parallel und / oder senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts, zur Bestimmung der zweidimensionalen Verteilung des eingekoppelten Anregungslichts im Bereich besagten Arrays, umfasst.

Es ist vorgesehen, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität eine Durchschnittsbildung über mehrere ortsaufgelöste Referenzsignale umfassen.

Ein weiteres wesentliches Merkmal des erfindungsgemäßen Kits betrifft Vorkehrungen, um in Anwesenheit einer oder mehrerer Analyten erfasste Lumineszenzsignale zu kalibrieren. Eine mögliche Ausführungsform besteht darin, dass besagte Vorkehrungen zur Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe von Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen der nachzuweisenden Analyten auf eine vorbestimmte Anzahl von Arrays umfassen. Beispielsweise ist es möglich, dass 8 – 12 Arrays einer Sensorplattform für Kalibrationszwecke vorgesehen sind.

Mit der Vielzahl von Messbereichen auf einer Sensorplattform ermöglicht der erfindungsgemäße Kit eine weitere, bislang nicht beschriebene Möglichkeit der Kalibration. Diese besteht darin, dass es im wesentlichen nicht notwendig ist, eine Vielzahl von Kalibrationslösungen mit unterschiedlichen, bekannten Konzentrationen auf ein oder mehrere Arrays zu geben, sondern in den für Kalibrationszwecke vorgesehenen Messbereichen die zum Analytnachweis eingesetzten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente in bekannter, aber unterschiedlicher lokaler Konzentration zu immobilisieren. Ebenso wie durch Zugabe verschiedener Kalibrationslösungen unterschiedlicher Analytkonzentrationen auf ein Array mit

Erkennungselementen in einer einzelnen konstanten Immobilisierungsdichte eine Kalibrationskurve generiert werden kann, ist es prinzipiell möglich, eine solche Standardkurve, welche die Bindungsaktivität und Häufigkeit der Bindungseignisse zwischen einem Analyten und seinen Nachweiselementen widerspiegelt, durch Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung auf ein Array mit Erkennungselementen in einer unterschiedlichen Immobilisierungsdichte zu erzeugen. Wesentlich für die Durchführbarkeit dieser vereinfachten Art der Kalibration ist, dass das Bindungsverhalten zwischen einem Analyten und seinen Erkennungselementen genau bekannt ist, und dass die Variation, d.h. die Spannbreite zwischen niedrigster und höchster Immobilisierungsdichte in den für einen Analyten vorgesehenen Messbereichen zur Kalibration ausreichend ist, um den gesamten für die Analytdetektion vorgesehenen Arbeitsbereich eines Assays abzudecken.

Daher ist weiterer Gegenstand der Erfindung ein Kit, welcher dadurch gekennzeichnet ist, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind. Dabei wird besonders bevorzugt, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen "Variation" dieser in unterschiedlicher kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.

In einer anderen Ausführungsform des erfindungsgemässen Kits sind zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten jeweils mehrere Messbereiche von unterschiedlicher Grösse (Durchmesser) vorgesehen. Aufgrund der bekannten Tatsache, dass die zu erwartende Signalintensität (Signalhöhe pro Flächeneinheit des dafür vorgesehenen Messbereichs) mit abnehmender Fläche des Messbereichs ansteigt, ermöglicht diese

Ausführungsform eine Vergrösserung des dynamischen Bereichs zum Nachweis besagter Analyten.

Erfindungsgemäss besteht eine weitere Möglichkeit darin, dass ein oder mehrere Arrays ein oder mehrere Messbereiche umfassen, welche dem Nachweis eines zu Kalibrationszwecken einer Probe hinzugefügten Analyten mit bekannter Konzentration dienen. Diese Ausführungsform ist vergleichbar mit der Zugabe von sogenannten bekannten Standards in analytischen Trennverfahren. Voraussetzung ist auch bei dieser Ausführungsform, dass des Bindungsverhalten zwischen dem zusätzlich zu einer oder allen Proben hinzuzufügenden Analyten und seinen immobilisierten Erkennungselementen genau bekannt ist. Dann lassen sich beispielsweise Unterschiede in den Bindungssignalen dieses bekannten zusätzlichen Analyten (z.B. infolge von Variationen der physikalischen Eigenschaften der Probe wie Viskosität etc.) übertragen auf entsprechende Unterschiede im Bindungsverhalten der nachzuweisenden Analyten in unbekannter Konzentration. Insbesondere eignet sich diese Ausführungsform auch zu einer Kombination mit der vorangehend beschriebenen Variante.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein analytisches System mit einer beliebigen Ausführungsform des erfundungsgemässen Kits, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich mindestens einen Detektor zur Erfassung einer oder mehrerer Lumineszenzen von der Gitter-Wellenleiter-Struktur umfasst.

Inbesondere Gegenstand der Erfindung ist ein analytisches System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen, mit

- mindestens einer Anregungslichtquelle
- einem erfundungsgemässen Kit sowie
- mindestens einem Detektor zur Erfassung des von einem oder mehreren Messbereichen (d) auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts.

Eine mögliche Ausführungsform des analytischen System ist dadurch gekennzeichnet,

dass das Anregungslicht in einer Auflicht- oder Transmissionslichtanordnung zu den Messbereichen eingestrahlt wird.

Es wird bevorzugt, dass die Detektion des Lumineszenzlichts derart erfolgt, dass das von einer Gitterstruktur (c) oder (c') ausgeteilte Lumineszenzlicht vom Detektor mit erfasst wird.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen analytischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Anregungslichtquelle ausgesandte Anregungslicht im wesentlichen parallel ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

Eine Möglichkeit besteht darin, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine grossflächige in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

Eine andere mögliche Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von der mindestens einen Lichtquelle durch ein oder, im Falle mehrerer Lichtquellen, gegebenenfalls mehrere diffraktive optische Elemente, vorzugsweise Dammann-Gitter, oder refraktive optische Elemente, vorzugsweise Mikrolinsen-Arrays, in eine Vielzahl von Einzelstrahlen möglichst gleicher Intensität der von einer gemeinsamen Lichtquelle stammenden Teilstrahlen zerlegt wird, welche jeweils im wesentlichen parallel zueinander auf Gitterstrukturen (c) unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die Schicht (a) eingestrahlt werden.

Eine Weiterbildung ist dadurch gekennzeichnet, dass als Anregungslichtquellen zwei oder mehrere Lichtquellen mit gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

Es wird bevorzugt, dass zur Detektion mindestens ein ortsauflösender Detektor verwendet wird, beispielsweise aus der Gruppe, die von CCD-Kameras, CCD-Chips, Photodioden-Arrays, Avalanche-Dioden-Arrays, Multichannelplates und Vielkanal-Photomultipliern gebildet wird.

Die Erfindung umfasst analytische Systeme, die dadurch gekennzeichnet sind, dass zwischen der einen oder mehreren Anregungslichtquellen und der Sensorplattform als Grundplatte, als Bestandteil eines erfindungsgemässen Kits, und /oder zwischen besagter Grundplatte und dem einen oder mehreren Detektoren optische Komponenten aus der Gruppe verwendet werden, die von Linsen oder Linsensystemen zur Formgestaltung der übertragenen Lichtbündel, planaren oder gekrümmten Spiegeln zur Umlenkung und gegebenenfalls zusätzlich zur Formgestaltung von Lichtbündeln, Prismen zur Umlenkung und gegebenenfalls zur spektralen Aufteilung von Lichtbündeln, dichroischen Spiegeln zur spektral selektiven Umlenkung von Teilen von Lichtbündeln, Neutralfiltern zur Regelung der übertragenen Lichtintensität, optischen Filtern oder Monochromatoren zur spektral selektiven Übertragung von Teilen von Lichtbündeln oder polarisationsselektiven Elementen zur Auswahl diskreter Polarisationsrichtungen des Anregungs- oder Lumineszenzlichts gebildet werden.

Die Lichtanregung kann kontinuierlich erfolgen. Es wird jedoch bevorzugt, dass die Einstrahlung des Anregungslichts in Pulsen mit einer Dauer zwischen 1 fsec und 10 Minuten erfolgt.

Eine Weiterentwicklung des analytischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass das Emissionslicht aus den Messbereichen zeitlich aufgelöst gemessen wird.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemässen analytischen Systems erfolgen Einstrahlung und Erfassung des Emissionslichts von allen Messbereichen simultan. Eine andere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Einstrahlung des

Anregungslichts auf und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen sequentiell für einzelne oder mehrere Probenbehältnisse erfolgt. Es ist auch möglich, dass innerhalb eines einzelnen Probenbehältnisses mehrfach sequentiell Einstrahlung des Anregungslichts und Detektion des Emissionslichts von einem oder mehreren Messbereichen erfolgen.

Bevorzugt wird dabei, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung beweglicher optischer Komponenten erfolgt, die aus der Gruppe von Spiegeln, Umlenkprismen und dichroischen Spiegeln gebildet wird. Sequentielle Anregung und Detektion kann auch unter Verwendung beweglicher Glasfasern oder Glasfaserbündel erfolgen, mit denen das Anregungs- bzw. Lumineszenzlicht sequentiell einem oder mehreren Messbereichen zu- bzw. von ihnen abgeführt wird.

Bei sequentieller Detektion der Lumineszenz von verschiedenen Messbereichen ist ein ortsauflösender Detektor nicht zwingend erforderlich, sondern es kann in diesem Falle ein einfacher Detektor wie beispielsweise ein herkömmlicher Photomultiplier oder eine Photodiode oder eine Avalanche-Photodiode verwendet werden.

Insbesondere wird bevorzugt, dass sequentielle Anregung und Detektion unter Verwendung eines im wesentlichen winkel- und fokusgetreuen Scanners erfolgt.

Eine andere Ausführungsform eines analytischen Systems mit sequentieller Anregung und Detektion ist dadurch gekennzeichnet, dass die erfindungsgemäße Anordnung zwischen Schritten der sequentiellen Anregung und Detektion bewegt wird.

Es wird weiterhin bevorzugt, dass das erfindungsgemäße analytische System zusätzlich Zuführungsmittel umfasst, um die eine oder mehrere Proben mit den Messbereichen auf der Sensorplattform in Kontakt zu bringen.

Eine mögliche Ausführungsform besteht darin, dass die Probenbehältnisse auf der von der optisch transparenten Schicht (a) abgewandten Seite Öffnungen zur lokal addressierten Zugabe oder Entfernung der Proben oder anderer Reagentien besitzen.

Eine Weiterentwicklung des analytischen Systems ist dadurch gekennzeichnet, dass Behältnisse für Reagentien vorgesehen sind, welche während des Verfahrens zum Nachweis des einen oder mehrerer Analyten benutzt und mit den Messbereichen in Kontakt gebracht werden. Eine besondere Ausführungsform besteht darin, dass diese zusätzlichen Behältnisse für besagte Reagentien in dem mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammenzubringenden Körper angeordnet sind.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten mit einem erfindungsgemäßen Kit entsprechend einer der beschriebenen Ausführungsformen und / oder unter Verwendung eines erfindungsgemäßen analytischen Systems, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere auf besagte Analyten zu untersuchende flüssige Proben mit den Messbereichen auf einer Sensorplattform als Teil besagten Kits in Kontakt gebracht werden, in ortsauflöster Weise die in besagten Messbereichen verfügbare Anregungslichtintensität referenziert wird und gegebenenfalls eine oder mehrere im Nahfeld der Schicht (a) erzeugte Lumineszenzen aus den mit besagter Probe oder besagten Proben in Kontakt gebrachten Messbereichen, als Folge der Bindung eines oder mehrerer Analyten an die in besagten Messbereichen immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente oder der Wechselwirkung zwischen besagten Analyten und besagten immobilisierten Erkennungselementen, kalibriert werden.

Es wird bevorzugt, dass das Anregungslicht zu den Messbereichen über die Gitterstruktur (c) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelt wird.

Eine mögliche Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform gleichförmige, unmodulierte Bereiche der

Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.

Es wird bevorzugt, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über Gitterstrukturen (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.

Bestandteil des erfindungsgemässen Verfahrens ist, dass zur Erzeugung der Lumineszenz ein Lumineszenzfarbstoff oder lumineszentes Nanopartikel als Lumineszenzlabel verwendet wird, das bei einer Wellenlänge zwischen 300 nm und 1100 nm angeregt werden kann und emittiert.

Es wird bevorzugt, dass das Lumineszenzlabel an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente gebunden ist.

Eine andere Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden.

Dabei wird bevorzugt, dass das zweite oder noch weitere Lumineszenzlabel bei der gleichen Wellenlänge wie der erste Lumineszenzfarbstoff angeregt werden können, aber bei anderen Wellenlängen emittieren.

Für andere Anwendungen ist es von Vorteil, wenn die Anregungsspektren und Emissionsspektren der eingesetzten Lumineszenzfarbstoffe nur wenig oder gar nicht überlappen.

Eine Variante des Verfahrens besteht darin, dass zum Nachweis des Analyten Ladungs- oder optischer Energietransfer von einem als Donor dienenden ersten Lumineszenzfarbstoff zu einem als Akzeptor dienenden zweiten Lumineszenzfarbstoff verwendet wird.

Eine andere mögliche Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass das Ausmass der Löschung ("Quenching") einer oder mehrerer Lumineszenzen bestimmt wird.

Eine weitere Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass neben der Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den Messbereichen bestimmt werden.

Eine Weiterentwicklung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden.

Es wird bevorzugt, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Grössenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

Eine Weiterentwicklung des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass Arrays von Messbreichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Messbereichen zur Referenzierung, d.h. Bestimmung physikalischer Parameter und / oder chemischer Unterschiede zwischen verschiedenen aufgebrachten Proben. Dabei können ein oder mehrere Arrays Segmente von zwei oder mehr Messbereichen mit innerhalb des Segments gleichartigen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur Analytbestimmung oder Referenzierung umfassen. Ein Segment kann aber auch mehrere diskrete Messbereiche mit voneinander unterschiedlichen Erkennungselementen enthalten.

Eine mögliche Variante des erfindungsgemässen Verfahrens besteht darin, dass auf einem oder mehreren Segmenten eines Arrays oder einem oder mehreren Arrays gleichzeitig verschiedene Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise unterschiedliche Zytokine durch ihre Bindung an unterschiedliche immobilisierte Anti-Zytokin-Antikörper, bestimmt werden.

Für bestimmte Anwendungen, beispielsweise beim Nachweis niedermolekularer Verbindungen in der Immunoanalytik oder beim Nachweis von Einzelpunktmutationen in der Nukleinsäurenanalytik, ist eine Kreuzreaktivität zu den (bio)chemisch ähnlichen Verwandten des betreffenden Analyten kaum auszuschliessen. Für derartige Anwendungen ist eine solche Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens vorteilhaft, in denen ein oder mehrere Messbereiche eines Segments oder eines Arrays der Bestimmung desselben Analyten zugeordnet sind und deren immobilisierte biologische oder biochemische Erkennungselemente unterschiedlich hohe Affinitäten zu besagtem Analyten aufweisen. Die Erkennungselemente sind dabei zweckmässigerweise so ausgewählt, dass sich ihre Affinitäten zu verschiedenen, einander (bio)chemisch ähnlichen Analyten in unterschiedlicher, charakteristischer Weise ändern. Aus der Gesamtheit der Signale von verschiedenen Messbereichen mit unterschiedlichen Erkennungselementen für einen einzelnen Analyten lässt sich dann, in vergleichbarer Weise zu einem Fingerabdruck, die Identität des Analyten bestimmen.

Eine andere mögliche Variante zeichnet sich dadurch aus, dass auf einem oder mehreren Segmenten eines Arrays oder einem oder mehreren Arrays gleichzeitig verschiedene Analyten aus unterschiedlichen Gruppen, wie beispielsweise pharmazeutische Präparate ("Drugs") zur Behandlung einer Krankheit und / oder deren Metaboliten und / oder die Nachweissubstanzen für diese Krankheit, wie beispielsweise sogenannte "Markerproteine", bestimmt werden.

Beispielsweise zur Untersuchung von Fragen der Reproduzierbarkeit kann es von Vorteil sein, wenn für den Nachweis jedes Analyten oder zur physikalischen oder chemischen Referenzierung 2 oder mehr identische Messbereiche innerhalb eines Segments oder Arrays vorgesehen sind. Dabei können besagte identische Messbereiche zum Beispiel in einer durchgehenden Reihe oder Spalte oder Diagonalen eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sein.

Zur Untersuchung anderer Fragestellungen, beispielsweise zur Untersuchung systematischer lokaler Unterschiede in den Anregungsbedingungen, kann es vorteilhaft sein, wenn besagte identische Messbereiche statistisch innerhalb eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.

Eine mögliche Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Anregungswellenlänge umfasst. Bevorzugt wird dabei, dass die Erstellung des Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts über denselben optischen Weg wie die Erfassung der von den Messbereichen ausgehenden Lumineszenzen erfolgt.

Eine andere mögliche Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren

Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Lumineszenzwellenlänge umfasst.

Eine weitere Ausführungsform ist dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei einer anderen Anregungswellenlänge als zur Anregung einer Lumineszenz umfassen. Dabei wird bevorzugt, dass die Anregungswellenlänge für die ortsaufgelöste Referenzierung so ausgewählt wird, dass im Laufe des Verfahrens zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten oder zu Zwecken der Referenzierung oder Kalibration eingesetzte lumineszenzfähige Moleküle bei besagter Wellenlänge keine oder nur eine möglichst geringe Absorption aufweisen, so dass Effekte des "photochemischen Ausbleichens" vermieden oder minimiert werden können.

Es wird bevorzugt, dass die Ortsauflösung des Bildes des von der Sensoplattform abgestrahlten Anregungslichts auf der Sensorplattform besser als 100 µm, bevorzugt besser als 20 µm beträgt.

Weiterer Gegenstand des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität mittels "Lumineszenzmarker-Spots", d.h. Bestimmung der Lumineszenzintensität aus Messbereichen mit präimmobilisierten (d.h. vor der Zugabe einer Probe bereits in diesen Messbereichen aufgebrachten) lumineszenzmarkierten Molekülen, erfolgt.

Dabei wird bevorzugt, dass die "Lumineszenzmarker-Spots" in einem Raster aufgebracht sind, das die ganze Sensorplattform überspannt.

Eine Weiterentwicklung des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass die Dichte der lumineszenzmarkierten Moleküle mittels Mischung mit gleichartigen, unmarkierten Molekülen bei der Immobilisierung so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzintensität aus den Bereichen der Lumineszenzmarkerspots von ähnlicher

Größenordnung wie die Lumineszenzintensität der aus den für einen Analytnachweis vorgesehenen Messbereiche ist.

Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass die Dichte und Konzentration der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb der "Lumineszenzmarker-Spots" innerhalb eines Arrays, bevorzugt auf der gesamten Sensorplattform, einheitlich sind.

Eine bekannte Tatsache ist, dass ein lumineszenzfähiges Molekül nur eine beschränkte Anzahl von Zyklen der Anregung durch ein äusseres Anregungslicht und seiner nachfolgenden Deaktivierung, in Form der abgestrahlten Lumineszenz, erfahren kann, bevor es photochemisch zerstört, d.h. in ein anderes, im allgemeinen nicht mehr lumineszenzfähiges Molekül umgewandelt wird. Diesen Prozess bezeichnet man allgemein als "Photobleaching". Die Anzahl der möglichen Aktivierungs- und Deaktivierungszyklen ist eine für eine bestimmte Molekülart charakteristische durchschnittliche Größe (ähnlich der Halbwertszeit einer radioaktiven Substanz). Um die Wirksamkeit der Referenzierung in dem erfindungsgemässen Verfahren in möglichst hohem Masse zu gewährleisten, wird bevorzugt, dass eine Verminderung der Signale aus den "Lumineszenzmarker-Spots", beispielsweise infolge "Photobleachings" bei Justierungen des optischen Systems, minimiert wird.

Weiterhin wird bevorzugt, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität eine Durchschnittsbildung über mehrere ortsaufgelöste Referenzsignale umfasst.

Die Zugabe der einen oder mehreren Proben und der im Nachweisverfahren einzusetzenden Nachweisreagentien kann sequentiell in mehreren Schritten erfolgen. Es wird bevorzugt, dass die eine oder mehreren Proben mit einer Mischung aus den verschiedenen Nachweisreagentien zur Bestimmung der in besagten Proben nachzuweisenden Analyten vorinkubiert werden und diese Mischungen dann in einem

einzigsten Zugabeschritt den dafür vorgesehenen Arrays auf der Sensorplattform zugeführt werden.

Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass die Konzentration der Nachweisreagentien, wie beispielsweise sekundärer Nachweisantikörper und / oder Lumineszenzlabel und optional zusätzlicher lumineszenzmarkierter Nachweisreagentien in einem Sandwich-Immunoassay, so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Größenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

Weiterer Gegenstand einer erfindungsgemäßen Ausführungsform des Verfahrens ist, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe von einer oder mehreren Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen besagter zu bestimmender Analyten auf die gleichen oder andere Messbereiche oder Segmente von Messbereichen oder Arrays von Messbereichen auf einer Sensorplattform umfasst, denen im gleichen oder einem separaten Zugabeschritt die eine oder die mehreren zu untersuchenden Proben zugeführt werden.

Eine besondere Ausführungsform des Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe eines gegebenfalls zusätzlichen Analyten bekannter Konzentration zu einer oder mehreren zu untersuchenden Proben zum Nachweis auf einem oder mehreren hierfür ausgewiesenen Messbereichen der Sensorplattform umfasst.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen den Vergleich der Lumineszenzintensitäten nach Zugabe einer unbekannten und einer Kontroll-Probe, wie beispielsweise einer "wild type"-DNA-Probe und einer "mutant DNA"-Probe, umfasst. Es ist dabei möglich, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe zu unterschiedlichen Arrays erfolgt.

Eine andere Variante dieses Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe sequentiell zu dem gleichen Array erfolgt. Bei dieser Ausführungsform ist im allgemeinen zwischen der Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe ein Regenerierungsschritt notwendig, d.h. die Dissoziation von nach Zugabe der ersten Probe gebildeten Erkennungselement-Analyt-Komplexen, gefolgt von der Entfernung der dissozierten Analytmoleküle aus den Probenbehältnissen, bevor die Zugabe der zweiten Probe erfolgen kann. In ähnlicher Weise können in sequentieller Form auch mehrere Proben auf einem Array von Messbereichen auf ihre Analyten untersucht werden.

Eine andere mögliche Ausführungsform des Verfahrens besteht darin, dass die unbekannte Probe und die Kontrollprobe gemischt werden und dann die Mischung einem oder mehreren Arrays einer Sensorplattform zugeführt wird.

Eine Weiterentwicklung des erfindungsgemäßen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der in der unbekannten und der Kontrollprobe nachzuweisenden Analyten mittels Lumineszenzlabels von unterschiedlicher Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlänge für die unbekannte und die Kontrollprobe erfolgt.

Beispielsweise wird bevorzugt, dass zur Bestimmung von Analyten aus verschiedenen Gruppen der Nachweis unter Verwendung von zwei oder mehr Lumineszenzlabels mit unterschiedlichen Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlängen erfolgt.

Die Verwendung mehrerer unterschiedlicher Lumineszenzlabel kann auch bei der Bestimmung verschiedener Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe vorteilhaft sein. Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemässen Verfahrens besteht daher darin, dass, beispielsweise zur Bestimmung der Kreuzreaktivität zwischen verschiedenen Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise der Zytokine, und ihren Erkennungselementen, wie beispielsweise Anti-Zytokin-Antikörpern, der Nachweis unter Verwendung von zwei oder mehr Lumineszenzlabeln mit unterschiedlichen Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlängen erfolgt.

Wie vorangehend beschrieben, eröffnet der erfindungsgemässen Kit mit der grossen Anzahl von Messbereichen auf einer Sensorplattform die Möglichkeit einer vereinfachten Form der Kalibration zur qualitativen und / oder quantitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten auf einem oder mehreren Arrays. Im besten Fall ist bei dieser neuen, erfindungsgemässen Form der Kalibration der Signale einer Sensorplattform die Zugabe nur einer einzigen Kalibrationslösung erforderlich. In dieser Weiterentwicklung des erfindungsgemässen Verfahrens wird daher bevorzugt, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind. Diese Weiterentwicklung des Verfahrens zeichnet sich dadurch aus, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen "Variation" dieser in unterschiedlicher kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.

Eine weitere, bevorzugte Variante des erfindungsgemässen Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer

Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Bestimmung der Lumineszenzintensität aufgrund der Anwesenheit eines oder mehrerer in einer Serie von Proben in im wesentlichen konstanter Konzentration vorhandenen Analyten umfasst. Beispielweise sind in der DNA-Analytik, insbesondere für den Vergleich sogenannter "wild type" und "mutant" Proben sogenannte "Housekeeping Genes" bekannt, deren Häufigkeit in einer Serie von Proben ähnlicher Herkunft (Gewebe, Typ des Organismus etc.) im wesentlichen konstant ist. Ebenso sind in der Immunoanalytik bestimmte Immunoglobuline bekannt, deren Konzentration sich zwischen verschiedenen Proben eines gemeinsamen Typs von Organismen nur wenig ändert.

Bestandteil der Erfindung ist ein Verfahren nach einer der vorgenannten Ausführungsformen zur gleichzeitigen oder sequentiellen, quantitativen oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren oder "Histidin-tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

Mögliche Ausführungsformen des Verfahrens sind auch dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb oder optisch trübe Flüssigkeiten oder Gewebeflüssigkeiten oder Oberflächenwasser oder Boden- oder Pflanzenextrakte oder Bio- oder Syntheseprozessbrühen oder aus biologischen Gewebeteilen oder aus Zellkulturen oder -extrakten entnommen sind.

Weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Kits und / oder eines erfindungsgemäßen analytischen Systems und / oder eines erfindungsgemäßen Verfahrens zu quantitativen oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur

Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätsscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Gen- oder Protein-Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und -forschung, der Human- und Veterinärdiagnostik, der Agrochemischen Produktentwicklung und -forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen, Viren und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

Die nachfolgenden Ausführungsbeispiele erläutern die Erfindung beispielhaft.

## Ausführungsbeispiele

### Beispiel 1:

#### Kit zur gleichzeitigen quantitativen Bestimmung mehrerer Zytokin-Markerproteine in einer und mehreren Analysenproben

a) Hauptbestandteil eines erfindungsgemässen Kits ist eine rechteckige Sensorplattform mit den äusseren Abmessungen 113.5 mm x 75.0 mm x 0.7 mm Dicke, verbunden mit einer 11 mm starken Polycarbonat (PC)-Schicht, welche zur Unterdrückung von Streulichtartefakten schwarz eingefärbt ist. In der PC-Schicht wurden offene, quadratische Ausparungen (Wells) mit jeweils 7 mm x 7 mm Kantenlänge, in einem (Zentrum-zu-Zentrum) Abstand von 9 mm geformt, die als Probenbehältnisse zur Aufnahme von Analysenvolumina (10-100  $\mu$ l) dienen. Die Ausparungen sind in Form von 12 Spalten und 8 Reihen in einer Ebene angeordnet, so dass die Kombination aus der Sensorplattform und der PC-Struktur insgesamt 96 Probenbehältnisse umfasst.

Das Substratmaterial der Sensorplattform (optisch transparente Schicht (b) ) besteht aus AF 45 Glas (Brechungsindex  $n = 1.52$  bei 633 nm). Im Substrat wurden durchgehende Oberflächenreliefgitter im Abstand von je 9 mm, mit einer Breite von 0.5 mm (in Ausbreitungsrichtung des über die Gitterstruktur in die Schicht (a) der Sensorplattform einzukoppelnden Anregungslichts) erzeugt. Diese Gitter weisen eine Periode von 360 nm und eine Tiefe von 12 nm auf, mit Orientierung der Gitterlinien parallel zu den Spalten der Wells. Die wellenleitende, optisch transparente Schicht (a) aus  $Ta_2O_5$  auf der optisch transparenten Schicht (b) hat einen Brechungsindex von 2.11 bei 633 nm (Schichtdicke 150 nm). Infolge des Abscheidungsprozesses überträgt sich die Gitterstruktur der optisch transparenten Schicht (b) nahezu masstäblich im Verhältnis 1:1 in die Oberfläche der aufgebrachten Schicht (a).

Die Oberfläche der Sensorplattform wird vor dem Zusammenfügen mit der Polycarbonat-Struktur nasschemisch gereinigt, zuerst mehrfach mit Isopropanol, anschliessend mit konzentrierter Schwefelsäure, welche 2.5 % Ammoniumperoxodisulfat enthält.

Anschliessend wird als Haftvermittlungsschicht eine monomolekulare Schicht (Monolayer) von Mono-Octadecylphosphat in einem Selbstorganisierungsprozess (Self-Assembly) auf die hydrophile Wellenleiteroberfläche aufgebracht. Diese Oberflächenmodifizierung führt zu einer hydrophoben Oberfläche (Kontaktwinkel ca. 110° gegenüber Wasser). Der Prozess der Oberflächenmodifizierung wurde in der Literatur näher beschrieben (D. Brovelli et al., Langmuir 15 (1999) 4324 - 4327).

Auf die hydrophobe Oberfläche der mit der Haftvermittlungsschicht versehenen Sensorplattform werden 96 identische Arrays (in 12 Spalten x 8 Reihen) von je 42 Messbereichen (Spots), ihrerseits in einer Anordnung von jeweils 7 Reihen und 6 Spalten, mit einem Inkjet Plotter, Modell NP1C (Firma GeSiM mbH, Grosserkmannsdorf, DE) erzeugt.

b) Die Erkennungselemente zum Nachweis verschiedener Human-Interleukine, als Analyten aus der Gruppe der Zytokine (monoklonaler Maus anti-hIL-2, anti-hIL-4 und anti-hIL-6 Antikörper), werden in einer Konzentration zwischen 300 und 1000 µg/ml in zehnprozentiger phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, pH 7.4) rekonstituiert. Anschliessend werden die Antikörper-Lösungen in unterschiedlichem Ausmass in 10 % PBS (pH 7.4) verdünnt, welches bestimmt ist durch die Affinität des jeweiligen Antikörpers zum entsprechenden Antigen. Die erforderlichen Konzentrationen (100 µg/ml für anti-hIL-2 und anti-hIL-6 bzw. 50 µg/ml für anti hIL-4 Antikörper) wurden zuvor in Einzel-Interleukin-Immunoassays ermittelt. Hierdurch soll erreicht werden, dass der dynamische Bereich der zu erwartenden Signalintensitäten in einem Assay zum gleichzeitigen Nachweis aller drei Interleukine, innerhalb eines Arrays in derselben Grössenordnung liegt. An diesem Aspekt des Beispiels wird demonstriert, dass es durch geeignete Wahl der Immobilisierungsdichte verschiedener Erkennungselemente in diskreten Messbereichen, mit unterschiedlichen Affinitäten zu den jeweiligen nachzuweisenden Analyten, möglich ist, dass der dynamische Bereich der zu erwartenden Signalintensitäten in einem Assay zum gleichzeitigen Nachweis einer Vielzahl unterschiedlicher Analyten, innerhalb eines Arrays in derselben Grössenordnung liegt.

Nach dem Aufbringen der Antikörper auf die Haftvermittlungsschicht wird für 15 min in gesättigter Wasserdampfatmosphäre inkubiert, anschliessend die nicht proteinbedeckte, hydrophobe Oberfläche der Sensorplattform mit einer Lösung von Rinderserumalbumin (BSA) in PBS (1 mg/ml, pH 7.4) mit einem Zusatz von 0.05% Tween 20, abgesättigt, zur Minimierung unspezifischer Bindung von Detektionsantikörpern im späteren Nachweisverfahren, danach mit H<sub>2</sub>O gewaschen und mit Stickstoff getrocknet.

Der Durchmesser der Spots, mit einem Abstand (Zentrum-zu-Zentrum) von 500 µm, beträgt ca. 220 µm. Ein Einzelarray umfasst jeweils drei verschiedene Typen von Erkennungselementen (zur Erkennung von hIL-2, hIL-4 und hIL-6) sowie "Lumineszenzmarker-Spots" mit Cy5-fluoreszenzmarkiertem Rinderserumalbumin (Cy5-BSA). Die Immobilisierungsdichte des Cy5-BSA wird dabei so gewählt, dass die Fluoreszenzintensität dieser "Lumineszenzmarker-Spots" ebenfalls im dynamischen Bereich der erwarteten Signalintensitätsänderungen des Interleukinassays liegt. Als eine optimale Konzentration des Cy5-BSA in der Immobilisierungslösung wird für das vorliegende Beispiel eine 25 pikomolare Lösung von Cy5-BSA bestimmt, bei einer Markierungsrate von 10 Cy5-Molekülen pro BSA-Molekül. Weiterhin wird festgestellt, dass zur Erzielung einer homogenen Verteilung der fluoreszenzmarkierten BSA-Moleküle in den "Lumineszenzmarker-Spots" die Verwendung einer Mischung aus unmarkierten und fluoreszenzmarkierten BSA-Molekülen für die Immobilisierungslösung wesentlich besser geeignet ist als der Einsatz einer Lösung mit nur dem fluoreszenzmarkierten Protein, mit einer entsprechend niedrigeren Proteinkonzentration. Als optimal erweist sich eine Immobilisierungslösung mit einer Konzentration von 25 µg/ml unmarkiertem BSA in 10 % PBS (pH 7.4) und dem schon erwähnten Anteil von 25 pM Cy5-BSA. Die Reproduzierbarkeit der Aufbringung der "Lumineszenzmarker-Spots" wurde mit Sensorplattformen untersucht, welche in derselben Weise wie hier vorbeschrieben hergestellt wurden, deren Lumineszenzintensitäten in den "Lumineszenzmarker-Spots" aber mit einem regulären kommerziellen Scanner (Genetic Microsystems 418 Array Scanner) vermessen wurden. Dabei wurde eine Variation der jeweils über einen "Lumineszenzmarker-Spot" integrierten Lumineszenzintensität von nur 3 % bis 4 % festgestellt.

Die verschiedenen Erkennungselemente sind in drei Reihen mit jeweils vier Replikas identischer Messbereiche (Spots) gemäss Abb. 1 angeordnet, wobei die Reihen parallel zum sich im Wellenleiter ausbreitenden Anregungslicht verlaufen, um somit aus jeder Einzelmessung pro zuzuführender Probe bereits Daten zur statistischen Assayreproduzierbarkeit zu gewinnen. Die "Lumineszenzmarker-Spots" sind in vier Reihen mit je vier Spots, parallel zu den Reihen der Erkennungselement-Spots, angeordnet. Die "Lumineszenzmarker-Spots" dienen der Referenzierung des in den benachbarten Messbereichen zum Analytnachweis verfügbaren Anregungslichts; ihre Anordnung in Reihen parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die Schicht (a) einzukoppelnden und dort zu führenden Anregungslichts dient zusätzlich der Bestimmung der Dämpfung (Abschwächung) des Anregungslichts in Ausbreitungsrichtung. Zusätzlich sind noch zwei Spalten von "Lumineszenzmarker-Spots" mit je sieben Replikas zu Beginn und am Ende des Arrays, in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten und geführten Anregungslichts, angeordnet. Sie dienen der Bestimmung der Homogenität der verfügbaren Anregungslichtintensität parallel zu den Linien des Einkoppelgitters.

#### **Beispiel 2: Analytisches System mit einem erfindungsgemässen Kit**

Die Sensorplattform ist auf einer computergesteuerten Justiereinheit montiert, welche die Translation parallel und senkrecht zu den Gitterlinien sowie eine Rotation um eine Drehachse parallel zu den Gitterlinien der Sensorplattform erlaubt. Unmittelbar nach dem als Anregungslichtquelle benutzten Laser befindet sich im Lichtweg ein Shutter, um den Lichtweg zu blockieren, wenn keine Messdaten aufgenommen werden sollen. Zusätzlich können Neutralfilter oder Polarisatoren an dieser Stelle oder auch an anderen Positionen im weiteren Weg des Anregungslichts zur Sensorplattform in den Lichtweg gestellt werden, um die Anregungsintensität stufenweise oder kontinuierlich zu variieren.

Der Anregungslichtstrahl eines Helium-Neon-Lasers bei 632.8 nm (Melles-Griot 05-LHP-901, 1.1 mW) wird mit einer Zylinderlinse in einer Dimension aufgeweitet und durch eine spaltförmige Blende (0.5 mm x 7 mm Öffnung) geleitet, um so ein Lichtbündel von annähernd rechteckigem Querschnitt und annähernd homogener Querschnittsintensität zu erzeugen. Dabei ist die Polarisation des Laserlichts parallel zu den Gitterlinien der Sensorplattform ausgerichtet, zur Anregung des TE<sub>0</sub>-Modes unter Einkoppelbedingungen. Das Anregungslicht wird von der Rückseite der Sensorplattform, d.h. durch die optisch transparente Schicht (b) hindurch, auf das Einkoppelgitter innerhalb eines der 96 Probenbehältnisse gerichtet, wobei das Einkoppelgitter zu einem Array von Messbereichen innerhalb eines Probenbehältnisses sich unter den Bedingungen des Ausführungsbeispiels jeweils am linken Rand des quadratischen Wells befindet. Der Winkel zwischen der Sensorplattform und dem eingestrahlten Anregungslichtbündel wird durch Rotation um die vorgenannte Drehachse auf maximale Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) justiert. Mit den vorgenannten Parametern der Sensorplattform beträgt der Resonanzwinkel für die Einkopplung in Luft etwa 2.6°.

Als ortsauflösender Detektor dient eine CCD-Kamera (Ultra Pix 0401E, Astrocam, Cambridge, UK) mit Peltier-Kühlung (Betriebstemperatur -30 °C), mit einem Kodak-CCD-Chip KAF 0401 E-1. Die Signalerfassung und Fokussierung auf den CCD-Chip erfolgt mit Hilfe eines Computar-Tandem-Objektivs (f = 50 mm, 1:1.3). Zwischen den beiden Hälften des Tandem-Objektivs befinden sich, auf einem Filterwechsler montiert, 2 Interferenzfilter (Omega, Brattleborough, Vermont) mit Zentralwellenlänge von 680 nm und 40 nm Bandbreite, sowie entweder ein Neutralfilter (zur Transmission des abgeschwächten, gestreuten Anregungs- und sehr viel schwächeren Lumineszenzlichts von den Messbereichen) oder ein Neutralfilter in Kombination mit einem Interferenzfilter (zur Transmission des abgeschwächten, von den Messbereichen gestreuten Anregungslichts). Die Signale bei der Anregungs- und der Lumineszenzwellenlänge können alternierend gemessen werden. Die Auswertung der Daten erfolgt durch kommerziell erhältliche Bildverarbeitungssoftware (ImagePro Plus).

**Beispiel 3: Nachweisverfahren mit einem erfindungsgemässen Kit**

Zur spezifischen Erkennung der nachzuweisenden Interleukine wird das Format eines Sandwich-Assays gewählt.

***Probenvorbereitung:***

Von den zu quantifizierenden Interleukinen (hIL-2, hIL-4, hIL-6) werden 8 Misch-Kalibrationslösungen von je 50 µl in PBS (pH 7.4), mit 0.1% BSA und 0.05% Tween20 hergestellt, welche jeweils alle drei Interleukine in gleicher Konzentration enthalten (jeweils 0, 10, 30, 70, 150, 300, 600, 1000 pg/ml). Diese Kalibrationslösungen sind vorgesehen für die gleichzeitige Erstellung von Kalibrationskurven für alle drei Analyten mittels Applikation auf dafür ausgewiesenen Arrays auf der Sensorplattform.

Die Kalibrationslösungen, wie auch die Proben mit unbekannten, zu bestimmenden Konzentrationen der drei Interleukine als Analyten, werden anschliessend mit jeweils 50 µl einer Lösung gemischt, welche eine Mischung von drei sekundären polyklonalen Nachweisantikörpern enthält ( $5 \times 10^{-10}$  M biotinylierter anti-hIL-2-Antikörper,  $10^{-10}$  M biotinylierter anti-hIL-4-Antikörper und  $10^{-10}$  M biotinylierter anti-hIL-6-Antikörper in PBS (pH 7.4), mit 0.1% BSA und 0.05% Tween 20). Diese Mischungen von jeweils 100 µl Volumen werden dann gemischt mit je 100 µl einer  $5 \times 10^{-10}$  M Cy5-Streptavidin-Lösung (Amersham-Pharmacia) in PBS (pH 7.4), mit 0.1% BSA und 0.05% Tween 20. Die vorgenannten Konzentrationen der drei verschiedenen Detektions-Antikörper sind so gewählt, dass für alle drei Interleukine die erwarteten Fluoreszenzintensitätsänderungen, infolge der spezifischen Bindung der Antigen-Sekundärantikörper-Komplexe an ihre immobilisierten monoklonalen Erkennungsantikörper als Erkennungselemente in den diskreten Messbereiche, von gleicher Größenordnung sind, d.h. dass die entsprechenden Kalibrationskurven ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

An diesem Aspekt des Beispiels wird demonstriert, dass es durch geeignete Wahl der Konzentrationen der Nachweisreagenzien möglich ist, dass für alle in einem einzigen

Assay gleichzeitig nachzuweisenden Analyten die erwarteten Fluoreszenzintensitäten, infolge von deren spezifischen Bindung an die jeweiligen in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente, von gleicher Gräßenordnung sind, d.h. dass die entsprechenden Kalibrationskurven ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

Es folgt eine einstündige Inkubation der hergestellten Misch-Lösungen bei Raumtemperatur im Dunkeln, bevor die Inkubate (je 100 µl) in die Probenbehältnisse gefüllt werden. Die Kalibrationslösungen werden dabei in aufsteigender Konzentration in die Probenbehältnisse für die Arrays A1 bis H1 (Mikrotiterplattennomenklatur, siehe Abbildung 1) der Sensorplattform gefüllt, wobei die 88 zu untersuchenden Proben mit unbekannten Konzentrationen der drei Interleukine als Analyten in den verbleibenden Probenbehältnissen A2 bis H12 verteilt werden. Nach weiterer, zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln werden die Arrays ausgelesen.

*Auslesen der Arrays:*

Zum Auslesen der Fluoreszenzsignale aus den Messbereichen der verschiedenen Arrays wird die Sensorplattform mit den darauf erzeugten Probenbehältnissen und den darin befindlichen Lösungen auf die vorangehend beschriebene Justiereinheit innerhalb des analytischen Systems montiert. Zur Bestimmung der Lumineszenzsignale aus jedem Array wird die Sensorplattform jeweils auf maximale Einkopplung des Anregungslichts über die dem jeweiligen Array zugeordnete Gitterstruktur justiert, was mit Position des Filterwechslers für die Anregungswellenlänge kontrolliert wird. Anschliessend wird die Intensität des Fluoreszenzlichts aus den Messbereichen (Spots) der Arrays mit Position des Filterwechslers für die Lumineszenzwellenlänge gemessen. Das Auslesen der Arrays in den weiteren Probenbehältnissen erfolgt sequentiell, mittels Translation der Sensorplattform zur nächsten Position für das Auslesen der Lumineszenzsignale aus dem nächsten Probenbehältnis.

*Auswertung und Referenzierung:*

Die Bildanalyse erfolgt mit einer kommerziell erhältlichen Bildverarbeitungs-Software (Image Pro Plus). Dazu wird in jedem Array der integrale Fluoreszenzintensitätswert eines jeden Spots bestimmt. Für die drei verschiedenen Interleukine liegen demnach pro Array jeweils vier integrale Fluoreszenzintensitätswerte vor, von denen zu statistischen Zwecken anschliessend die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen berechnet werden.

Zusätzlich werden die zwei Cy5-BSA-Referenzspots ("Lumineszenzmarker-Spots"), aus der ersten Spalte des Arrays vor und der letzten Spalte nach der jeweiligen Reihe mit jeweils vier Messbereichen zur Interleukinbestimmung, gleichermassen ausgewertet und gemittelt. Dieser gemittelte Referenzwert dient jeweils für die Korrektur der Lumineszenzsignale aus den in der gleichen Reihe befindlichen Messbereichen für die Analytbestimmung.

Entsprechend werden für jedes Array die Mittelwerte der Cy5-BSA-Referenzspots vor und nach den Interleukin-Messbereichen in der jeweils gleichen Reihe gebildet. Aus diesen insgesamt 96 gemittelten Referenzwerten für jeden der drei Analyten wird jeweils wiederum ein Mittelwert gebildet. Der individuelle Korrekturfaktor für die Messwerte zur Analytbestimmung in einem Array ergibt sich dann als Quotient aus dem lokalen Referenzwert und dem letztgenannten Mittelwert. Durch Multiplikation mit diesem Korrekturfaktor werden die lokalen Unterschiede der verfügbaren Anregungslichtintensität auf einer gemeinsamen Sensorplattform kompensiert.

Zum Vergleich der Ergebnisse mit verschiedenen Sensorplattformen (im vorliegenden Beispiel drei Sensorplattformen) werden die nach dem oben beschriebenen Verfahren korrigierten Lumineszenzintensitäten auf den Wert 1 bei einer Interleukinkonzentration von 0 pg/ml normiert.

Abbildung 2 zeigt als Beispiel die für den Nachweis des Interleukin 4 erhaltenen, nicht korrigierten Rohdaten zur Kalibration dieses Multianalyt-Immunoassays, bei der die

integralen Fluoreszenzintensitätswerte in Abhängigkeit der hIL-4 Konzentration aufgetragen sind. Abbildung 3 zeigt die mithilfe der beschriebenen Mittelwertbildung erzeugten, korrigierten Kalibrationsdaten.

In Abbildung 4 ist als durchgezogene Kurve die an diese korrigierten Daten angepasste Hill-Funktion dargestellt. Die leeren Symbole zeigen die mit drei verschiedenen Sensorplattformen nach Korrektur bestimmten Kalibrationssignale. Die ausgefüllten Kreise stellen jeweils die daraus gebildeten Mittelwerte, bei den verschiedenen hIL-4-Konzentrationen, dar. Damit ergibt sich als überraschendes Gesamtergebnis, dass es mithilfe des erfindungsgemäßen Kits und dem darauf basierenden Nachweisverfahren gelungen ist, in einem auf jeweils einer Sensorplattform durchgeföhrten vollständigen Multianalytassay, unter Erstellung von jeweils einer vollständigen Kalibrationskurve auf jeder Plattform, eine Variabilität der Signale von nur 5 % bis 20 %, selbst beim Vergleich unterschiedlicher Sensorplattformen, zu erzielen (Abbildung 5).

**Patentansprüche**

1. Kit zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten, umfassend
  - eine Sensorplattform umfassend einen optischen Dünnschichtwellenleiter mit einer bei mindestens einer Anregungswellenlänge transparenten Schicht (a) auf einer bei mindestens dieser Anregungswellenlänge ebenfalls transparenten Schicht (b) mit niedrigerem Brechungsindex als Schicht (a) und mindestens einer in der Schicht (a) modulierten Gitterstruktur (c) zur Einkopplung besagten Anregungslichts in die Schicht (a),
  - mindestens ein Array von in diskreten Messbereichen (d) direkt auf oder über eine Haftvermittlungsschicht auf der Schicht (a) immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur spezifischen Erkennung und / oder Bindung besagter Analyten und / oder spezifischen Wechselwirkung mit besagten Analyten,
  - Vorkehrungen zur ortsauflösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität sowie gegebenenfalls
  - Vorkehrungen zur Kalibration einer oder mehrerer infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen,

wobei eine auf besagte Analyten zu untersuchende flüssige Probe entweder direkt oder nach Mischung mit weiteren Reagentien mit besagten Messbereichen auf besagter Sensorplattform in Kontakt gebracht wird.
2. Kit nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Brechungsindex der ersten optisch transparenten Schicht (a) grösser als 1.8 ist.
3. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 2, dadurch gekennzeichnet, dass die erste optisch transparente Schicht (a) ein Material aus der Gruppe von  $TiO_2$ ,  $ZnO$ ,  $Nb_2O_5$ ,  $Ta_2O_5$ ,  $HfO_2$ , oder  $ZrO_2$ , besonders bevorzugt aus  $TiO_2$  oder  $Nb_2O_5$  oder  $Ta_2O_5$ , umfasst.

4. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, dass das Produkt aus der Dicke der Schicht (a) und ihrem Brechungsindex ein Zehntel bis ein Ganzes, bevorzugt ein Drittel bis zwei Drittel, der Anregungswellenlänge eines in die Schicht (a) einzukoppelnden Anregungslichts beträgt.
5. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Material der zweiten optisch transparenten Schicht (b) Silikate, z. B. Glas oder Quarz, oder einen transparenten thermoplastischen oder spritzbaren Kunststoff, beispielsweise aus der Gruppe umfasst, die von Polycarbonat, Polyimid, Acrylat, insbesondere Polymethylmethacrylat, oder Polystyrol gebildet wird.
6. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, dass in der Schicht (a) modulierte Gitterstrukturen (c) eine Periode von 200 nm – 1000 nm aufweisen und ihre Modulationstiefe 3 bis 100 nm, bevorzugt 10 bis 50 nm beträgt.
7. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 6, dadurch gekennzeichnet, dass das Verhältnis von Modulationstiefe zur Dicke der ersten optisch transparenten Schicht (a) gleich oder kleiner als 0,4 ist.
8. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein Reliefgitter mit beliebigem Profil, beispielsweise mit Rechteck-, Dreieck- oder halbkreisförmigem Profil, oder ein Phasen- oder Volumengitter mit einer periodischen Modulation des Brechungsindex in der im wesentlichen planaren optisch transparenten Schicht (a) ist.
9. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) ein diffraktives Gitter mit einer einheitlichen Periode oder ein multidiffraktives Gitter ist.

10. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Gitterstruktur (c) eine senkrecht oder parallel zur Ausbreitungsrichtung des in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelten Anregungslichts räumlich variierende Periodizität aufweist.
11. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.
12. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 11, dadurch gekennzeichnet, dass Gitterstrukturen (c) der Einkopplung von Anregungslicht zu den Messbereichen (d) und / oder der Auskopplung von in die Schicht (a) rückgekoppeltem Lumineszenzlicht dienen.
13. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform eine Vielzahl von Gitterstrukturen (c) gleicher oder unterschiedlicher Periode mit optional daran anschliessenden gleichförmigen, unmodulierten Bereichen der Schicht (a) auf einem gemeinsamen, durchgehenden Substrat umfasst.
14. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 13, dadurch gekennzeichnet, dass jedem in Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts nachfolgenden Array von Messbereichen eine für dieses Array spezifische Gitterstruktur (c) zur Auskopplung dieses Anregungslichts zugeordnet ist, wobei senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts die Gitterstrukturen spezifisch für einzelne Arrays ausgebildet sein können oder sich auch über die ganze Sensorplattform in dieser Richtung erstrecken können.
15. Kit nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass das Einkoppelgitter eines in Ausbreitungsrichtung eines in der Schicht (a) einer Sensorplattform geführten Anregungslichts nachfolgenden Arrays als Auskoppelgitter für das am

Einkoppelgitter des in besagter Ausbreitungsrichtung vorangehenden Arrays eingekoppelte Anregungslicht dient.

16. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform eine Überlagerung von 2 oder mehreren Gitterstrukturen unterschiedlicher Periodizität mit zueinander paralleler oder nicht paralleler, vorzugsweise nicht paralleler Ausrichtung der Gitterlinien umfasst, welche der Einkopplung von Anregungslicht unterschiedlicher Wellenlänge dient, wobei im Falle von 2 überlagerten Gitterstrukturen deren Gitterlinien vorzugsweise senkrecht zueinander ausgerichtet sind.
17. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 16, dadurch gekennzeichnet, dass eine Gitterstruktur (c) oder eine Überlagerung mehrerer Gitterstrukturen in der Schicht (a) im wesentlichen über die gesamte Fläche der Sensorplattform moduliert ist.
18. Kit nach einem der Ansprüche 1 –17, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Sensorplattform optisch oder mechanisch erkennbare Markierungen zur Erleichterung der Justierung in einem optischen System und / oder zur Verbindung mit Probenbehältnissen als Teil eines analytischen Systems aufgebracht sind.
19. Kit nach einem der Ansprüche 1 -18, dadurch gekennzeichnet, dass sich zwischen den optisch transparenten Schichten (a) und (b) und in Kontakt mit Schicht (a) eine weitere optisch transparente Schicht (b') mit niedrigerem Brechungsindex als dem der Schicht (a) und einer Stärke von 5 nm – 10 000 nm, vorzugsweise von 10 nm - 1000 nm, befindet.
20. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 19, dadurch gekennzeichnet, dass zur Immobilisierung der biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente in den diskreten Messbereichen auf der optisch transparenten Schicht (a) eine Haftvermittlungsschicht (f) mit einer Stärke von vorzugsweise weniger als 200 nm, besonders bevorzugt von weniger als 20 nm aufgebracht ist, und

dass die Haftvermittlungsschicht (f) vorzugsweise eine chemische Verbindung aus den Gruppen umfasst, die Silane, Epoxide, funktionalisierte, geladene oder polare Polymere und "selbstorganisierte passive oder funktionalisierte Mono- oder Doppelschichten" umfassen.

21. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 20, dadurch gekennzeichnet, dass räumlich getrennte Messbereiche (d) durch räumlich selektive Aufbringung von biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen auf besagter Sensorplattform erzeugt werden, vorzugsweise unter Verwendung eines oder mehrerer Verfahren aus der Gruppe von Verfahren, die von "Ink jet spotting", mechanischem Spotting mittels Stift, Feder oder Kapillare, "micro contact printing", fluidischer Kontaktierung der Messbereiche mit den biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen durch deren Zufuhr in parallelen oder gekreuzten Mikrokanälen, unter Einwirkung von Druckunterschieden oder elektrischen oder elektromagnetischen Potentialen, sowie photochemischen oder photolithographischen Immobilisierungsverfahren gebildet werden.

22. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 21, dadurch gekennzeichnet, dass als besagte biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente Komponenten aus der Gruppe aufgebracht werden, die von Nukleinsäuren (beispielsweise DNA, RNA, Oligonukleotiden) und Nukleinsäureanalogen (z. B. PNA), mono- oder polyklonalen Antikörpern, Peptiden, Enzymen, Aptameren, synthetischen Peptidstrukturen, löslichen, membrangebundenen und aus einer Membran isolierten Proteinen, wie beispielsweise Rezeptoren, deren Liganden, Antigenen für Antikörper, "Histidin-Tag-Komponenten" und deren Komplexbildungspartnern, durch chemische Synthese erzeugten Kavitäten zur Aufnahme molekularer Imprints, etc. gebildet wird, oder dass als biologische oder biochemische oder synthetische Erkennungselemente ganze Zellen, Zellbestandteile, Zellmembranen oder deren Fragmente aufgebracht werden.

23. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 22, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Größenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

24. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 23, dadurch gekennzeichnet, dass Arrays von Messbereichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Messbereichen zur Referenzierung, d.h. Bestimmung physikalischer Parameter und / oder chemischer Unterschiede zwischen verschiedenen aufgebrachten Proben.

25. Kit nach einem der Ansprüche 1- 24, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Arrays Segmente von zwei oder mehr Messbereichen mit innerhalb des Segments gleichartigen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur Analytbestimmung oder Referenzierung umfassen.

26. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 25, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Segmente eines Arrays oder ein oder mehrere Arrays der Bestimmung von Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise mit immobilisierten Anti-Zytokin-Antikörpern zur Bestimmung unterschiedlicher Zytokine, zugeordnet sind.

27. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 26, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Messbereiche eines Segments oder eines Arrays der Bestimmung desselben Analyten zugeordnet sind und deren immobilisierte biologische oder biochemische Erkennungselemente unterschiedlich hohe Affinitäten zu besagtem Analyten aufweisen.

28. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 27, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Segmente eines Arrays oder ein oder mehrere Arrays der Bestimmung unterschiedlicher

Gruppen von Analyten, wie beispielsweise pharmazeutischer Präparate ("Drugs") zur Behandlung einer Krankheit und / oder derer Metaboliten und / oder der Nachweissubstanzen für diese Krankheit, wie beispielsweise sogenannter "Markerproteine", zugeordnet sind.

29. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 28, dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehr Arrays eine gleichartige geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

30. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 28, dadurch gekennzeichnet, dass zwei oder mehr Arrays eine unterschiedliche geometrische Anordnung von Messbereichen und / oder Segmenten von Messbereichen für die Bestimmung gleichartiger Analyten auf diesen Arrays aufweisen.

31. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 30, dadurch gekennzeichnet, dass für den Nachweis jedes Analyten oder zur physikalischen oder chemischen Referenzierung jeweils 2 oder mehr identische Messbereiche innerhalb eines Segments oder Arrays vorgesehen sind.

32. Kit nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass besagte identische Messbereiche in einer durchgehenden Reihe oder Spalte oder Diagonalen eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.

33. Kit nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass besagte identische Messbereiche statistisch innerhalb eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.

34. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 33, dadurch gekennzeichnet, dass Bereiche zwischen den räumlich getrennten Messbereichen zur Minimierung unspezifischer Bindung von Analyten oder deren Nachweissubstanzen "passiviert werden", d.h. dass

zwischen den räumlich getrennten Messbereichen (d) gegenüber dem Analyten "chemisch neutrale" Verbindungen aufgebracht sind, vorzugsweise beispielsweise bestehend aus den Gruppen, die von Albuminen, insbesondere Rinderserumalbumin oder Humanserumalbumin, Casein, unspezifischen, polyklonalen oder monoklonalen, artfremden oder empirisch für den oder die nachweisenden Analyten unspezifischen Antikörpern (insbesondere für Immunoassays), Detergentien – wie beispielsweise Tween 20 –, nicht mit zu analysierenden Polynukleotiden hybridisierender, fragmentierter natürlicher oder synthetischer DNA, wie beispielsweise ein Extrakt von Herings- oder Lachssperma (insbesondere für Polynukleotid-Hybridisierungsassays), oder auch ungeladenen, aber hydrophilen Polymeren, wie beispielsweise Polyethylenglycole oder Dextrane, gebildet werden.

35. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 33, dadurch gekennzeichnet, dass die Funktion der Passivierung von Bereichen zwischen den räumlich getrennten Messbereichen zur Minimierung unspezifischer Bindung von Analyten oder deren Nachweissubstanzen durch die Aufbringung einer Haftvermittlungsschicht nach Anspruch 20 auf der Sensorplattform, ohne Aufbringung zusätzlicher Substanzen, erfüllt wird.
36. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 35, dadurch gekennzeichnet, dass in einer 2-dimensionalen Anordnung bis zu 100 000 Messbereiche angeordnet sind und ein einzelner Messbereich eine Fläche von 0.001 – 6 mm<sup>2</sup> einnimmt.
37. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Oberseite der Sensorplattform mit den darauf erzeugten Messbereichen über der optisch transparenten Schicht (a) mit einem weiteren Körper derart zusammengebracht ist, dass zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und besagtem Körper eine oder mehrere räumliche Aussparungen zur Erzeugung eines oder mehrerer gegeneinander fluidisch abgedichteter Probenbehältnisse erzeugt werden, in denen jeweils ein oder mehrere Messbereiche oder Segmente oder Arrays von Messbereichen liegen.

38. Kit mit einer Anordnung von Probenbehältnissen gemäss Anspruch 37, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse als gegeneinander fluidisch abgedichtete Flusszellen mit jeweils mindestens einem Zulauf und mindestens einem Ablauf ausgebildet sind und gegebenenfalls zusätzlich mindestens ein Ablauf jeder Flusszelle in ein mit dieser Flusszelle fluidisch verbundenes Reservoir führt, welches aus der Flusszelle austretende Flüssigkeit aufnimmt.
39. Kit nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, dass das gegebenenfalls zusätzlich vorhandene Reservoir zur Aufnahme aus der Flusszelle austretender Flüssigkeit als eine Vertiefung in der Aussenwand des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers ausgebildet ist.
40. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 39, dadurch gekennzeichnet, dass auf der Sensorplattform als Grundplatte räumliche Strukturen im Raster des Arrays der zu erzeugenden Probenbehältnisse ausgebildet sind.
41. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 40, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung der räumlichen Aussparungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper Ausnehmungen in der Sensorplattform ausgebildet sind.
42. Kit nach einem der Ansprüche 37 - 41, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung der räumlichen Aussparungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengebrachten Körper Ausnehmungen in besagtem Körper ausgebildet sind.
43. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 37 oder 40 – 42, dadurch gekennzeichnet, dass die Probenbehältnisse auf der den Messbereichen gegenüberliegenden Seite des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers offen sind.

44. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 43, dadurch gekennzeichnet, dass die Anordnung von Probenbehältnissen 2 – 2000, vorzugsweise 2 – 400, besonders bevorzugt 2 – 100 einzelne Probenbehältnisse umfasst.
45. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 44, dadurch gekennzeichnet, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen und / oder Spalten) der Probenbehältnisse dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.
46. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 45, mit einer Anordnung von beispielsweise 2 bis 8 Probenbehältnissen in einer Spalte oder beispielsweise 2 bis 12 Probenbehältnissen in einer Zeile, welche ihrerseits mit einem Träger ("Metaträger") mit den Abmessungen von Standardmikrotiterplatten derart zusammengefügt werden, dass das Raster (Aufeinanderfolge in Zeilen oder Spalten) der Zuläufe der Probenbehältnisse dem Raster der Wells einer Standardmikrotiterplatte entspricht.
47. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 46, dadurch gekennzeichnet, dass die Anordnung von Probenbehältnissen durch einen zusätzlichen Abschluss, beispielsweise eine Folie, Membran oder eine Deckplatte, abgeschlossen wird.
48. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 47, dadurch gekennzeichnet, dass das Innenvolumen jedes Probenbehältnisses 0.1 µl – 1000 µl, bevorzugt 1 µl – 20 µl beträgt.
49. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 48, dadurch gekennzeichnet, dass die Tiefe der Ausnehmungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengefügten Körper 1 – 1000 µm, bevorzugt 20 – 200 µm beträgt.
50. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 49, dadurch gekennzeichnet, dass die Grundflächen der Ausnehmungen zwischen der Sensorplattform als Grundplatte und dem damit zusammengefügten Körpers jeweils 0.1 mm<sup>2</sup> – 200 mm<sup>2</sup>, bevorzugt 1 mm<sup>2</sup> – 100 mm<sup>2</sup> betragen, wobei die Grösse der Ausnehmungen eines Arrays einheitlich

oder unterschiedlich sein kann und die Grundflächen eine beliebige, vorzugsweise rechteck- oder polygonförmige oder auch andere Geometrie haben.

51. Kit nach einem der Ansprüche 37 – 50, dadurch gekennzeichnet, dass die Materialien des mit der Sensorplattform als Grundplatte zusammengebrachten Körpers sowie eines optionalen zusätzlichen Abschlusses nach Anspruch 47 ausgewählt sind aus der Gruppe von form-, spritz- oder fräsbaren Kunststoffen, Metallen, Silikaten, wie zum Beispiel Glas, Quarz oder Keramiken.
52. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 51, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Anregungswellenlänge umfassen.
53. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 52, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Lumineszenzwellenlänge umfassen.
54. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 53, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei einer anderen Anregungswellenlänge als zur Anregung einer Lumineszenz umfassen.
55. Kit nach Anspruch 52 oder Anspruch 54, dadurch gekennzeichnet, dass die Erstellung des Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts über denselben optischen Weg wie die Erfassung der von den Messbereichen ausgehenden Lumineszenzen erfolgt.

56. Kit nach einem der Ansprüche 52 - 55, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsauflösung des Bildes zur Referenzierung des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts auf der Sensorplattform besser als 100  $\mu\text{m}$ , bevorzugt besser als 20  $\mu\text{m}$  beträgt.
57. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 56, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die Bestimmung des Hintergrundsignals bei der jeweiligen Lumineszenzwellenlänge neben oder zwischen den Messbereichen umfassen.
58. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 57, dadurch gekennzeichnet, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität mittels "Lumineszenzmarker-Spots", d.h. Bestimmung der Lumineszenzintensität aus Messbereichen mit präimmobilisierten (d.h. vor der Zugabe einer Probe bereits in diesen Messbereichen aufgebrachten) lumineszenzmarkierten Molekülen, erfolgt.
59. Kit nach Anspruch 58, dadurch gekennzeichnet, dass die "Lumineszenzmarker-Spots" in einem Raster aufgebracht sind, das die ganze Sensorplattform überspannt.
60. Kit nach einem der Ansprüche 58 – 59, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb eines "Lumineszenzmarker-Spots" mittels Mischung mit gleichartigen, unmarkierten Molekülen bei der Immobilisierung so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzintensität aus den Bereichen der Lumineszenzmarkerspots von ähnlicher Größenordnung wie die Lumineszenzintensität der aus den für einen Analytnachweis vorgesehenen Messbereiche ist.

61. Kit nach einem der Ansprüche 58 – 60, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte und Konzentration der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb der “Lumineszenzmarker-Spots” innerhalb eines Arrays, bevorzugt auf der gesamten Sensorplattform, einheitlich sind.
62. Kit nach einem der Ansprüche 58 – 61, dadurch gekennzeichnet, dass der Abstand und / oder die Grösse verschiedener “Lumineszenzmarker-Spots” abgestimmt sind auf die erwünschte Ortsauflösung bei der Bestimmung der Lumineszenzintensitäten aus den diskreten Messbereichen.
63. Kit nach einem der Ansprüche 58 – 62, dadurch gekennzeichnet, dass jedes Array auf der Sensorplattform mindestens einen “Lumineszenzmarker-Spot” umfasst.
64. Kit nach einem der Ansprüche 58 – 63, dadurch gekennzeichnet, dass es zu jedem Segment von Messbereichen zur Bestimmung eines Analyten mindestens einen benachbarten “Lumineszenzmarker-Spot” gibt.
65. Kit nach einem der Ansprüche 58 – 64, dadurch gekennzeichnet, dass jedes Array eine durchgehende Reihe und / oder Spalte von “Lumineszenzmarker-Spots” parallel und / oder senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des eingekoppelten Anregungslichts, zur Bestimmung der zweidimensionalen Verteilung des eingekoppelten Anregungslichts im Bereich besagten Arrays, umfasst.
66. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 65, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität eine Durchschnittsbildung über mehrere ortsaufgelöste Referenzsignale umfassen.
67. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 66, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Vorkehrungen zur Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im

Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe von Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen der nachzuweisenden Analyten auf eine vorbestimmte Anzahl von Arrays umfassen.

68. Kit nach Anspruch 67, dadurch gekennzeichnet, dass 8 – 12 Arrays einer Sensorplattform für Kalibrationszwecke vorgesehen sind.
69. Kit nach einem der Ansprüche 1 - 68, dadurch gekennzeichnet, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind.
70. Kit nach Anspruch 69, dadurch gekennzeichnet, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen “Variation” dieser in unterschiedlicher kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.
71. Kit nach einem der Ansprüche 1 – 70, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Arrays ein oder mehrere Messbereiche umfassen, welche dem Nachweis eines zu Kalibrationszwecken einer Probe hinzugefügten Analyten mit bekannter Konzentration dienen.
72. Analytisches System mit einem Kit nach einem der Ansprüche 1 – 71, dadurch gekennzeichnet, dass es zusätzlich mindestens einen Detektor zur Erfassung einer oder mehrerer Lumineszenzen von der Gitter-Wellenleiter-Struktur umfasst.
73. Analytisches System zur Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen, mit

- mindestens einer Anregungslichtquelle  
- einem Kit nach einem der Ansprüche 1 – 71  
- mindestens einem Detektor zur Erfassung des von einem oder mehreren Messbereichen (d) auf der Sensorplattform ausgehenden Lichts.

74. Analytisches System nach Anspruch 73, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht in einer Auflicht- oder Transmissionslichtanordnung zu den Messbereichen eingestrahlt wird.

75. Analytisches System nach Anspruch 73 oder Anspruch 74, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion des Lumineszenzlichts derart erfolgt, dass das von einer Gitterstruktur (c) oder (c') ausgekoppelte Lumineszenzlicht vom Detektor mit erfasst wird.

76. Analytisches System nach einem der Ansprüche 72 - 75, dadurch gekennzeichnet, dass das von der mindestens einen Anregungslichtquelle ausgesandte Anregungslicht im wesentlichen parallel ist und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

77. Analytisches System nach einem der Ansprüche 73 - 76, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht von mindestens einer Lichtquelle mit einer Aufweitungsoptik zu einem im wesentlichen parallelen Strahlenbündel aufgeweitet wird und unter dem Resonanzwinkel zur Einkopplung in die optisch transparente Schicht (a) auf eine grossflächige in der Schicht (a) modulierte Gitterstruktur (c) eingestrahlt wird.

78. Verfahren zum gleichzeitigen qualitativen und / oder quantitativen Nachweis einer Vielzahl von Analyten mit einem Kit nach einem der Ansprüche 1 – 71 und / oder unter Verwendung eines analytischen Systems nach einem der Ansprüche 72 - 77, dadurch gekennzeichnet, dass eine oder mehrere auf besagte Analyten zu

untersuchende flüssige Proben mit den Messbereichen auf einer Sensorplattform als Teil besagten Kits in Kontakt gebracht werden, in ortsaufgelöster Weise die in besagten Messbereichen verfügbare Anregungslichtintensität referenziert wird und gegebenenfalls eine oder mehrere im Nahfeld der Schicht (a) erzeugte Lumineszenzen aus den mit besagter Probe oder besagten Proben in Kontakt gebrachten Messbereichen, als Folge der Bindung eines oder mehrerer Analyten an die in besagten Messbereichen immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen oder der Wechselwirkung zwischen besagten Analyten und besagten immobilisierten Erkennungselementen, kalibriert werden.

79. Verfahren nach Anspruch 78, dadurch gekennzeichnet, dass das Anregungslicht zu den Messbereichen über die Gitterstruktur (c) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelt wird.
80. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 79, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorplattform gleichförmige, unmodulierte Bereiche der Schicht (a) umfasst, welche vorzugsweise in Ausbreitungsrichtung des über eine Gitterstruktur (c) eingekoppelten und in der Schicht (a) geführten Anregungslichts angeordnet sind.
81. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 80, dadurch gekennzeichnet, dass (1) die isotrop abgestrahlte Lumineszenz oder (2) in die optisch transparente Schicht (a) eingekoppelte und über Gitterstrukturen (c) ausgekoppelte Lumineszenz oder Lumineszenzen beider Anteile (1) und (2) gleichzeitig gemessen werden.
82. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 81, dadurch gekennzeichnet, dass zur Erzeugung der Lumineszenz ein Lumineszenzfarbstoff oder lumineszentes Nanopartikel als Lumineszenzlabel verwendet wird, das bei einer Wellenlänge zwischen 300 nm und 1100 nm angeregt werden kann und emittiert.
83. Verfahren nach Anspruch 82, dadurch gekennzeichnet, dass das Lumineszenzlabel an den Analyten oder in einem kompetitiven Assay an einen Analogen des Analyten

oder in einem mehrstufigen Assay an einen der Bindungspartner der immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen oder an die biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselemente gebunden ist.

84. Verfahren nach einem der Ansprüche 82 – 83, dadurch gekennzeichnet, dass ein zweites oder noch weitere Lumineszenzlabel mit gleicher oder unterschiedlicher Anregungswellenlänge wie das erste Lumineszenzlabel und gleicher oder unterschiedlicher Emissionswellenlänge verwendet werden
85. Verfahren nach Anspruch 84, dadurch gekennzeichnet, dass das zweite oder noch weitere Lumineszenzlabel bei der gleichen Wellenlänge wie der erste Lumineszenzfarbstoff angeregt werden können, aber bei anderen Wellenlängen emittieren.
86. Verfahren nach Ansprache 84, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungsspektren und Emissionsspektren der eingesetzten Lumineszenzfarbstoffe nur wenig oder gar nicht überlappen.
87. Verfahren nach einem der Ansprüche 84 - 85, dadurch gekennzeichnet, dass zum Nachweis des Analyten Ladungs- oder optischer Energietransfer von einem als Donor dienenden ersten Lumineszenzfarbstoff zu einem als Akzeptor dienenden zweiten Lumineszenzfarbstoff verwendet wird.
88. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 87, dadurch gekennzeichnet, dass die einen oder mehreren Lumineszenzen und / oder Bestimmungen von Lichtsignalen bei der Anregungswellenlänge polarisationsselektiv vorgenommen werden, wobei vorzugsweise die einen oder mehreren Lumineszenzen bei einer anderen Polarisation als der des Anregungslichts gemessen werden.

89. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 88, dadurch gekennzeichnet, dass neben der Bestimmung einer oder mehrerer Lumineszenzen Änderungen des effektiven Brechungsindex auf den Messbereichen bestimmt werden.
90. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 89, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der in diskreten Messbereichen immobilisierten Erkennungselemente zum Nachweis unterschiedlicher Analyten auf unterschiedlichen Messbereichen so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Größenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.
91. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 90, dadurch gekennzeichnet, dass Arrays von Messbereichen aufgeteilt sind in Segmente von ein oder mehreren Messbereichen zur Bestimmung von Analyten und Messbereichen zur Referenzierung, d.h. Bestimmung physikalischer Parameter und / oder chemischer Unterschiede zwischen verschiedenen aufgebrachten Proben.
92. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 91, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Arrays Segmente von zwei oder mehr Messbereichen mit innerhalb des Segments gleichartigen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zur Analytbestimmung oder Referenzierung umfassen.
93. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 92, dadurch gekennzeichnet, dass ein oder mehrere Messbereiche eines Segments oder eines Arrays der Bestimmung desselben Analyten zugeordnet sind und deren immobilisierte biologische oder biochemische Erkennungselemente unterschiedlich hohe Affinitäten zu besagtem Analyten aufweisen.

94. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 93, dadurch gekennzeichnet, dass auf einem oder mehreren Segmenten eines Arrays oder einem oder mehreren Arrays gleichzeitig verschiedene Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise unterschiedliche Zytokine durch ihre Bindung an unterschiedliche immobilisierte Anti-Zytokin-Antikörper, bestimmt werden.
95. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 94, dadurch gekennzeichnet, dass auf einem oder mehreren Segmenten eines Arrays oder einem oder mehreren Arrays gleichzeitig verschiedene Analyten aus unterschiedlichen Gruppen, wie beispielsweise pharmazeutische Präparate (“Drugs”) zur Behandlung einer Krankheit und / oder deren Metaboliten und / oder die Nachweissubstanzen für diese Krankheit, wie beispielsweise sogenannte “Markerproteine”, bestimmt werden.
96. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 95, dadurch gekennzeichnet, dass für den Nachweis jedes Analyten oder zur physikalischen oder chemischen Referenzierung 2 oder mehr identische Messbereiche innerhalb eines Segments oder Arrays vorgesehen sind.
97. Verfahren nach Anspruch 96, dadurch gekennzeichnet, dass besagte identische Messbereiche in einer durchgehenden Reihe oder Spalte oder Diagonalen eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.
98. Verfahren nach Anspruch 96, dadurch gekennzeichnet, dass besagte identische Messbereiche statistisch innerhalb eines Arrays oder Segments von Messbereichen angeordnet sind.
99. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 98, dadurch gekennzeichnet, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Anregungswellenlänge umfasst.

100. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 99, dadurch gekennzeichnet, dass die Vorkehrungen zur ortsaufgelösten Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei einer anderen Anregungswellenlänge als zur Anregung einer Lumineszenz umfassen.
101. Verfahren nach Anspruch 100, dadurch gekennzeichnet, dass die Anregungswellenlänge für die ortsaufgelöste Referenzierung so ausgewählt wird, dass im Laufe des Verfahrens zum Nachweis eines oder mehrerer Analyten oder zu Zwecken der Referenzierung oder Kalibration eingesetzte lumineszenzfähige Moleküle bei besagter Wellenlänge keine oder nur eine möglichst geringe Absorption aufweisen.
102. Verfahren nach einem der Ansprüche 99 – 101, dadurch gekennzeichnet, dass die Erstellung des Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Anregungslichts über denselben optischen Weg wie die Erfassung der von den Messbereichen ausgehenden Lumineszenzen erfolgt.
103. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 102, dadurch gekennzeichnet, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität die gleichzeitige oder sequentielle Erstellung eines Bildes des von der Sensorplattform abgestrahlten Lichts bei der Lumineszenzwellenlänge umfasst.
104. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 103, dadurch gekennzeichnet, dass die Ortsauflösung des Bildes des von der Sensoplattform abgestrahlten Anregungslichts auf der Sensorplattform besser als 100  $\mu\text{m}$ , bevorzugt besser als 20  $\mu\text{m}$  beträgt.
105. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 104, dadurch gekennzeichnet, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren

Anregungslichtintensität mittels "Lumineszenzmarker-Spots", d.h. Bestimmung der Lumineszenzintensität aus Messbereichen mit präimmobilisierten (d.h. vor der Zugabe einer Probe bereits in diesen Messbereichen aufgebrachten) lumineszenzmarkierten Molekülen, erfolgt.

106. Verfahren nach Anspruch 105, dadurch gekennzeichnet, dass die "Lumineszenzmarker-Spots" in einem Raster aufgebracht sind, das die ganze Sensorplattform überspannt.

107. Verfahren nach einem der Ansprüche 105 – 106, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte der lumineszenzmarkierten Moleküle mittels Mischung mit gleichartigen, unmarkierten Molekülen bei der Immobilisierung so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzintensität aus den Bereichen der "Lumineszenzmarkerspots" von ähnlicher Größenordnung wie die Lumineszenzintensität der aus den für einen Analytnachweis vorgesehenen Messbereiche ist.

108. Verfahren nach einem der Ansprüche 105 – 107, dadurch gekennzeichnet, dass die Dichte und Konzentration der lumineszenzmarkierten Moleküle innerhalb der "Lumineszenzmarker-Spots" innerhalb eines Arrays, bevorzugt auf der gesamten Sensorplattform, einheitlich sind.

109. Verfahren nach einem der Ansprüche 105 – 108, dadurch gekennzeichnet, dass eine Verminderung der Signale aus den "Lumineszenzmarker-Spots", beispielsweise infolge "Photobleachings" bei Justierungen des optischen Systems, minimiert wird.

110. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 109, dadurch gekennzeichnet, dass die ortsaufgelöste Referenzierung der in den Messbereichen verfügbaren Anregungslichtintensität eine Durchschnittsbildung über mehrere ortsaufgelöste Referenzsignale umfasst.

111. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 110, dadurch gekennzeichnet, dass die eine oder mehreren Proben mit einer Mischung aus den verschiedenen Nachweisreagentien zur Bestimmung der in besagten Proben nachzuweisenden Analyten vorinkubiert werden und diese Mischungen dann in einem einzigen Zugabeschritt den dafür vorgesehenen Arrays auf der Sensorplattform zugeführt werden.

112. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 111, dadurch gekennzeichnet, dass die Konzentration der Nachweisreagentien, wie beispielsweise sekundärer Nachweisantikörper und / oder Lumineszenzlabel und optional zusätzlicher lumineszenzmarkierter Nachweisreagentien in einem Sandwich-Immunoassay, so ausgewählt ist, dass die Lumineszenzsignale beim Nachweis verschiedener Analyten in einem gemeinsamen Array von gleicher Größenordnung sind, d.h., dass die zugehörigen Kalibrationskurven für die gleichzeitig durchzuführenden Analytbestimmungen ohne eine Änderung der optoelektronischen Systemeinstellungen aufgenommen werden können.

113. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 112, dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe von einer oder mehreren Kalibrationslösungen mit bekannten Konzentrationen besagter zu bestimmender Analyten auf die gleichen oder andere Messbereiche oder Segmente von Messbereichen oder Arrays von Messbereichen auf einer Sensorplattform umfasst, denen im gleichen oder einem separaten Zugabeschritt die eine oder die mehreren zu untersuchenden Proben zugeführt werden.

114. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 113, dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Zugabe eines gegebenfalls zusätzlichen

Analyten bekannter Konzentration zu einer oder mehreren zu untersuchenden Proben zum Nachweis auf einem oder mehreren hierfür ausgewiesenen Messbereichen der Sensorplattform umfasst.

115. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 114, dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen den Vergleich der Lumineszenzintensitäten nach Zugabe einer unbekannten und einer Kontroll-Probe, wie beispielsweise einer "wild type"-DNA-Probe und einer "mutant DNA"-Probe, umfasst.
116. Verfahren nach Anspruch 115, dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe zu unterschiedlichen Arrays erfolgt.
117. Verfahren nach Anspruch 115, dadurch gekennzeichnet, dass die Zugabe der unbekannten Probe und der Kontrollprobe sequentiell zu dem gleichen Array erfolgt.
118. Verfahren nach Anspruch 115, dadurch gekennzeichnet, dass die unbekannte Probe und die Kontrollprobe gemischt werden und dann die Mischung einem oder mehreren Arrays einer Sensorplattform zugeführt wird.
119. Verfahren nach einem der Ansprüche 115 – 118, dadurch gekennzeichnet, dass die Detektion der in der unbekannten und der Kontrollprobe nachzuweisenden Analyten mittels Lumineszenzlabels von unterschiedlicher Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlänge für die unbekannte und die Kontrollprobe erfolgt.
120. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 119, dadurch gekennzeichnet, dass zur Bestimmung von Analyten aus verschiedenen Gruppen der Nachweis unter Verwendung von zwei oder mehr Lumineszenzlabels mit unterschiedlichen Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlängen erfolgt.

121. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 119, dadurch gekennzeichnet, dass, beispielsweise zur Bestimmung der Kreuzreakтивität zwischen verschiedenen Analyten aus einer gemeinsamen Gruppe, wie beispielsweise der Zytokine, und ihren Erkennungselementen, wie beispielsweise Anti-Zytokin-Antikörpern, der Nachweis unter Verwendung von zwei oder mehr Lumineszenzlabeln mit unterschiedlichen Anregungs- und / oder Lumineszenzwellenlängen erfolgt.

122. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 121, dadurch gekennzeichnet, dass in einem oder mehreren Arrays jeweils mehrere Messbereiche mit dort in einer unterschiedlichen, kontrollierten Dichte immobilisierten biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen zum Nachweis eines für diese Messbereiche gemeinsamen Analyten vorgesehen sind.

123. Verfahren nach Anspruch 122, dadurch gekennzeichnet, dass bei bekannter Konzentrationsabhängigkeit der Bindungssignale zwischen einem Analyten und seinen biologischen oder biochemischen oder synthetischen Erkennungselementen und einer ausreichend grossen "Variation" dieser in unterschiedlicher, kontrollierter Dichte in verschiedenen Messbereichen eines Arrays immobilisierten Erkennungselemente bereits mittels Zugabe einer einzigen Kalibrationslösung zu diesem Array eine Kalibrationskurve für diesen Analyten erstellt werden kann.

124. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 - 123, dadurch gekennzeichnet, dass die Kalibration von infolge der Bindung eines oder mehrerer Analyten oder infolge der spezifischen Wechselwirkung mit einem oder mehreren Analyten im Nahfeld der Schicht (a) erzeugten Lumineszenzen die Bestimmung der Lumineszenzintensität aufgrund der Anwesenheit eines oder mehrerer in einer Serie von Proben in im wesentlichen konstanter Konzentration vorhandenen Analyten umfasst.

125. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 124 zur gleichzeitigen oder sequentiellen, quantitativen oder qualitativen Bestimmung eines oder mehrerer Analyten aus der Gruppe von Antikörpern oder Antigenen, Rezeptoren oder Liganden, Chelatoren

oder "Histidin-tag-Komponenten", Oligonukleotiden, DNA- oder RNA-Strängen, DNA- oder RNA-Analoga, Enzymen, Enzymcofaktoren oder Inhibitoren, Lektinen und Kohlehydraten.

126. Verfahren nach einem der Ansprüche 78 – 125, dadurch gekennzeichnet, dass die zu untersuchenden Proben natürlich vorkommende Körperflüssigkeiten wie Blut, Serum, Plasma, Lymphe oder Urin oder Eigelb oder optisch trübe Flüssigkeiten oder Gewebeflüssigkeiten oder Oberflächenwasser oder Boden- oder Pflanzenextrakte oder Bio- oder Syntheseprozessbrühen sind oder aus biologischen Gewebeteilen oder aus Zellkulturen oder -extrakten entnommen sind.

127. Verwendung eines Kits nach einem der Ansprüche 1 – 71 und / oder eines analytischen Systems nach einem der Ansprüche 72 – 77 und / oder eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 78 – 126 zu quantitativen oder qualitativen Analysen zur Bestimmung chemischer, biochemischer oder biologischer Analyten in Screeningverfahren in der Pharmaforschung, der Kombinatorischen Chemie, der Klinischen und Präklinischen Entwicklung, zu Echtzeitbindungsstudien und zur Bestimmung kinetischer Parameter im Affinitätsscreening und in der Forschung, zu qualitativen und quantitativen Analytbestimmungen, insbesondere für die DNA- und RNA-Analytik, für die Erstellung von Toxizitätsstudien sowie für die Bestimmung von Gen- oder Protein-Expressionsprofilen sowie zum Nachweis von Antikörpern, Antigenen, Pathogenen oder Bakterien in der pharmazeutischen Produktentwicklung und -forschung, der Human- und Veterinärdiagnostik, der Agrochemischen Produktentwicklung und -forschung, der symptomatischen und präsymptomatischen Pflanzendiagnostik, zur Patientenstratifikation in der pharmazeutischen Produktentwicklung und für die therapeutische Medikamentenauswahl, zum Nachweis von Pathogenen, Schadstoffen und Erregern, insbesondere von Salmonellen, Prionen, Viren und Bakterien, in der Lebensmittel- und Umweltanalytik.

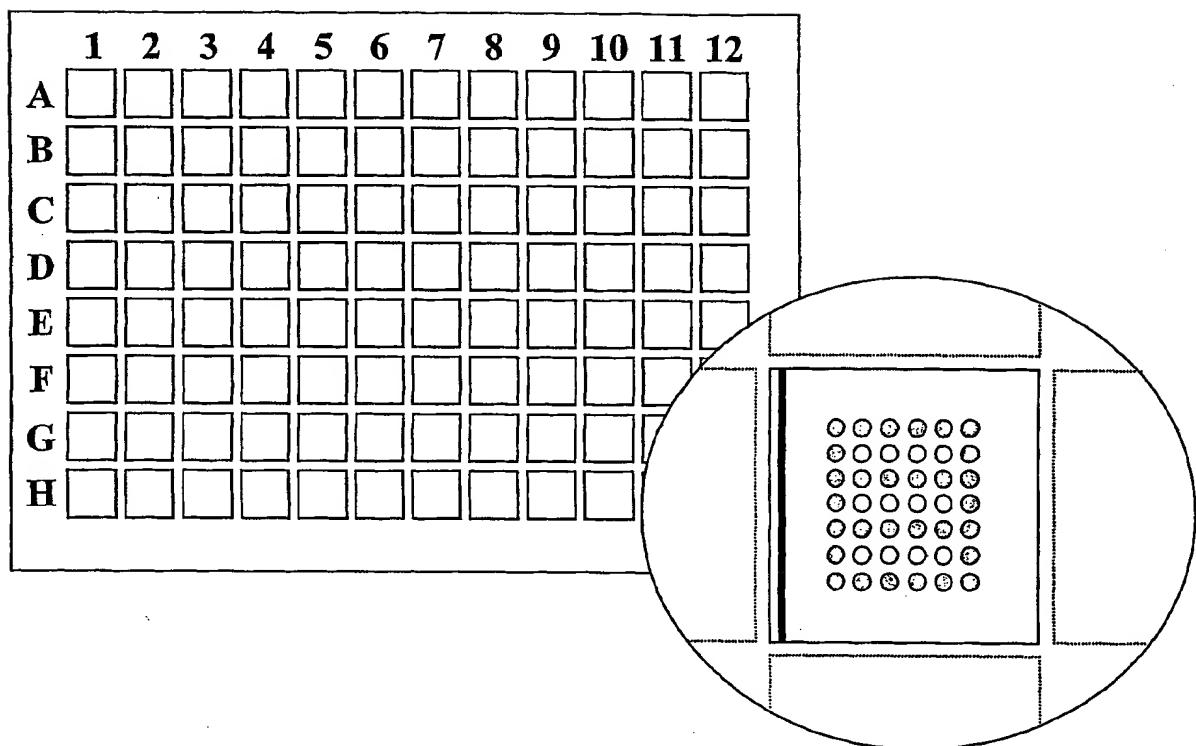


FIG. 1

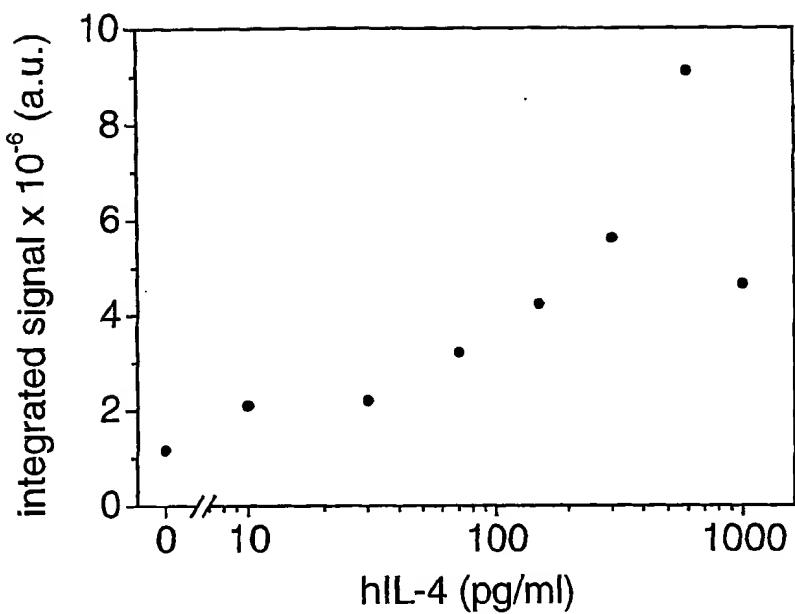


Fig. 2

3 / 4

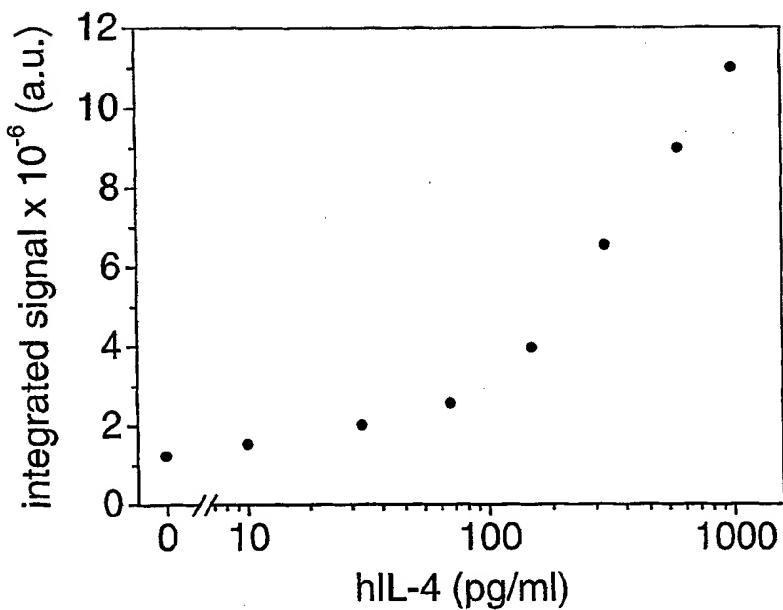


Fig. 3

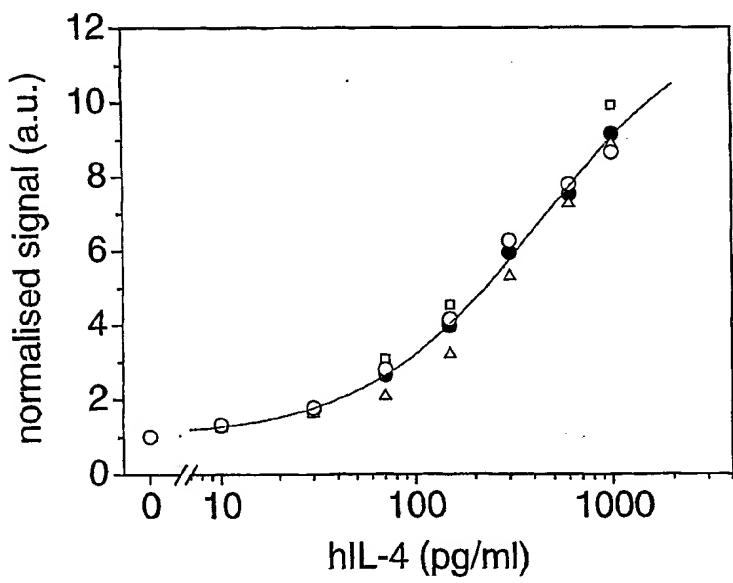


Fig. 4

4/4

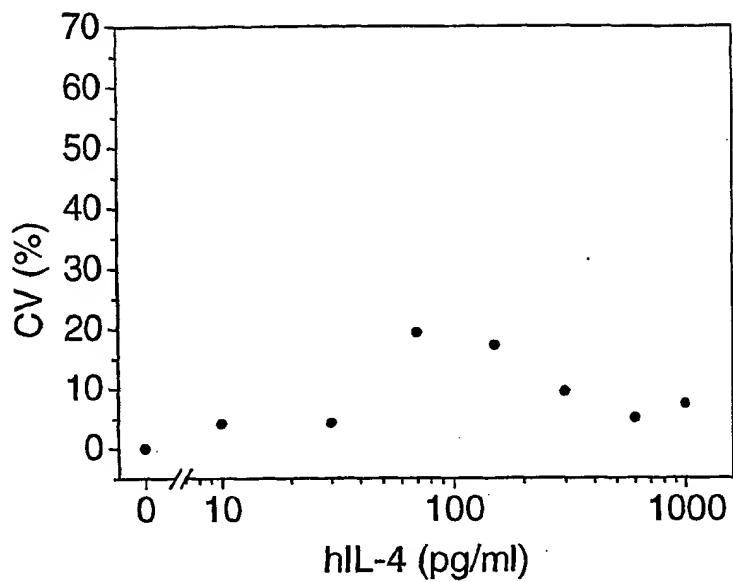


Fig. 5



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

